

**CLADIS LOREN KIEFER**

**SENSIBILIDADE AUDITIVA DE NEURÔNIOS MESENCEFÁLICOS EM  
POMBOS (*Columba livia*).**

**Florianópolis**

**1999**

**CLADIS LOREN KIEFER**

**SENSIBILIDADE AUDITIVA DE NEURÔNIOS  
MESENCEFÁLICOS EM POMBOS (*Columba livia*).**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
Mestre.

Curso de Pós-graduação em  
Neurociências Centro de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal de  
Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Odival Cesar  
Gasparoto.

FLORIANÓPOLIS

1999

**“SENSIBILIDADE AUDITIVA DE NEURÔNIOS MESENCEFÁLICOS DE  
POMBOS (*Columba livia*)”**

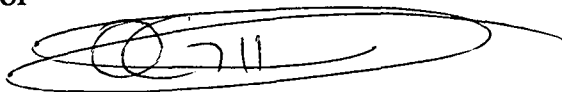
**CLADIS LOREN KIEFER**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO**

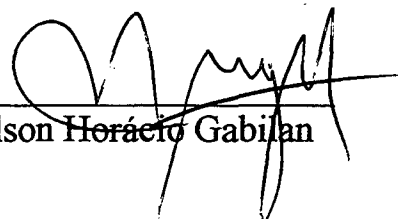
na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final  
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento.

Orientador



Odival Cezar Gasparotto

Coordenador do Curso

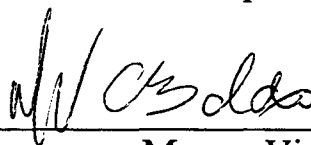


Nelson Horácio Gabilan

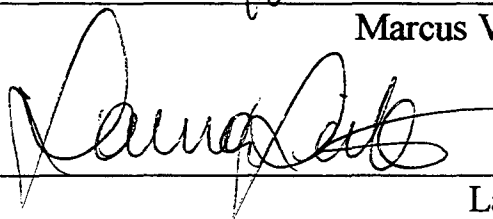
Banca Examinadora



Odival Cezar Gasparotto (Presidente)



Marcus Vinícius C. Baldo



Laura Difini Leite

*“Feliz o homem que acha sabedoria, e o homem  
que adquire conhecimento”.*

Pv. 3:13

À MINHA FAMÍLIA

*meu carinho e gratidão pelo apoio e  
compreensão*

FERNANDO

*Obrigado por existir e pelo amor.*

*Motivação maior deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor DR. ODIVAL CESAR GASPAROTTO, Orientador,

*pela oportunidade concedida por acreditar  
em meu potencial. Pela orientação e colabora-  
ção, muito obrigado*

Ao professor DR. CLAUDIO TOLEDO, Co-orientador,

*pela acolhida, pelo incentivo, pelo  
fundamental apoio e colaboração durante o  
desenvolvimento deste trabalho e pelos  
questionamentos.*

À amiga ZULEIDE um agradecimento especial,

*pelo apoio em todos os momentos, pelo ombro  
acolhedor e pela paciência em ouvir nos  
momentos mais difíceis, por ser quem é.*

Ao FERNANDO

*pelo constante incentivo, dedicação  
e cumplicidade. Que soube respeitar minhas  
angústias e repartir comigo as alegrias*

Aos técnicos, LUCIANE, CARLINHOS

*pela agradável convivência nos laboratórios.*

Aos funcionários NIVALDO, D. VILMA

*pelos bons momentos compartilhados e pela  
companhia.*

Aos professores CRISTINA, MAURO, MOACIR, LAURA, MARINO E MARTA

*pela presença e pela acolhida, pelas sugestões  
dadas em todos os momentos*

Aos Professores CLAUDIO E RICARDO

*pelo apoio e presença importantes e por  
permitirem o uso de seus laboratórios*



## SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
1.1. O Sistema Auditivo.....	1
1.2. Considerações anatômicas do Sistema Auditivo.....	2
1.3. O Sistema Auditivo de Mamíferos.....	11
1.4. Sensibilidade Interaural em Aves.....	12
1.5. Atividade Espontânea das Fibras Auditivas.....	14
1.6. Integração das Vias Sensoriais.....	15
1.7. Considerações Anatômicas Gerais.....	17
1.8. Justificativa.....	18
1.9. Objetivos.....	19
2. Material e Métodos.....	20
2.1. Preparação.....	20
2.2. Estereotaxia.....	21
2.3. Aquisição de dados.....	21
2.4. Estimulação auditiva.....	22

2.5. Análise histológica.....	23
2.6. Análise de dados.....	24
3. Resultados.....	26
3.1. Localização.....	26
3.2. Atividade Celular.....	30
4. Discussão.....	42
4.1. Localização Anatômica das Unidades Registradas.....	42
4.2. Atividade Espontânea das Unidades Registradas.....	43
4.3. Influência do Estímulo Binaural e Monaural.....	46
4.4. Frequência Característica das Unidades Registradas.....	48
5. Referências Bibliográficas.....	52

## RESUMO

Dos núcleos cocleares primários aos núcleos telencefálicos, o sistema auditivo é composto de neurônios com sensibilidade ao tempo interaural ou diferença de nível interaural e/ou frequências características diferentes. Ao contrário de mamíferos em outros vertebrados o sistema auditivo não é bem conhecido. Muitas pesquisas usando corujas e aves canoras, contribuíram para entender como o sistema nervoso central processa o som. Numa abordagem eletrofisiológica esta pesquisa feita em pombos *Columba livia* mostrou neurônios que respondem a estímulos auditivos em áreas até então não descritas como sendo sensíveis a estes estímulos. Estes neurônios não se localizam em núcleos auditivos clássicos, mas numa área mesencefálica e diencefálica que vai ventralmente desde a margem ântero-lateral do núcleo da Raiz Óptica Basal (nBOR), até o trato occiptomesencefálico e ansa lenticular, dorsalmente. As características funcionais dos neurônios foram analisadas considerando suas diferenças de nível interaural e frequências características (FC). As unidades mostraram atividade espontânea (AE) estáveis de 47,4Hz em média. A FC foi tipicamente baixa, variando de 100 a 1.000Hz. As respostas foram significantes para estímulos de 100 a 500Hz. A estimulação binaural e ipsolateral ou contralateral monaural, não induziu respostas diferentes. Já que esta área auditiva não foi descrita anteriormente na literatura como fazendo parte da via auditiva clássica, e como estes neurônios se situam próximos às estruturas centrais somatosensorial e oculomotora, ela pode representar uma área de integração do sistema nervoso auditivo com outras modalidades sensoriais. Suas características funcionais sugerem que estes neurônios estão envolvidos com a discriminação tonal e não com a localização do som.

## ABSTRACT

From the auditory cochlear nuclei to telencephalic nuclei the auditory system is composed of neurons with sensibility to interaural time or level difference and/or different characteristic frequencies. Differently of mammals, in other vertebrates the auditory system is not well known. Many researches using owls and songbirds have contributed to understand how the central nervous system processes the sound. In an electrophysiological approach, our studies on pigeon (*Columba livia*) have shown neurons responding to auditory stimulation in areas not reported previously as having this sensibility. These units are not clustered in a typical nucleus but in a mesencephalic and diencephalic area ventrally from the anterolateral margin of the Basal Optic Root nucleus (nBOR) to the occipitomesencephalic tract and ansa lenticularis dorsally. The functional characteristics of the neurons were analyzed regarding their interaural level differences and characteristic frequency (CF). The units showed stable spontaneous activities of 47.4Hz in average. The characteristic frequency was typically low, ranging from 100 to 1,000Hz. The responses were significant to stimulus from 100 to 500Hz. The binaural stimulation and ipso or contralateral monaural stimulation did not induce different responses. Since this auditory area is not reported in the literature as part of the classical auditory system, and their neurons are near the somatosensorial and oculomotor central structures, it may represent an area of integration of the auditory nervous system with other sensorial modalities. Their functional characteristics suggest that these neurons are involved with tonal discrimination and not with sound localization.

## I - INTRODUÇÃO

### 1. O Sistema Auditivo de Aves

Como parte dos órgãos dos sentidos, a importância do sistema auditivo está na interação social de todos os vertebrados com o meio.

Como a comunicação sonora em aves é de grande importância, tanto no processo de marcação de território como no acasalamento, passou-se então a demonstrar o grande valor deste sistema auditivo, que apesar da simplicidade anatômica, revelou um intrincado mecanismo de alta eficiência funcional. Uma vez que as ondas sonoras carregam informações a grandes distâncias, as aves utilizam a audição tanto no comportamento de distribuição de território, como na cômte e identificação de presas (ou caça), atividades que demandam uma grande especialização por este sistema sensorial (Konishi, 1973).

De acordo com Yoerg (1992), a frequência média e máxima de sensibilidade para os pássaros é de 1Khz a 4Khz, estando a sensibilidade dos homens 18 dB (decibéis) acima da sensibilidade das aves. Enquanto a frequência de audibilidade em humanos é de 20Hz a 20.000Hz, no gânglio coclear de pombos existem unidades neuronais capazes de detectar infra-sons (<20Hz) (Schermuly e Klinke, 1990). Humanos são capazes de discriminar diferenças de intensidade de 0 a 120 dB.

## **2. Considerações Anatômicas do Sistema Auditivo**

### Organização do Sistema Auditivo Periférico de Aves

Há diferenças estruturais entre o ouvido das aves e dos mamíferos. Sabe-se que as aves não têm pavilhão auditivo (aurícula), sugerindo que as penas ao redor do meato acústico desempenham função de funil em relação aos sons que nela chegam (Yoerg, 1992), assumindo a função do ouvido externo. As penas minimizam as turbulências de ar que possam ocorrer, sem obstruir a transmissão do som para o tímpano (Necker, 1983). O sistema auditivo das aves e mamíferos consiste em ouvido externo, médio e interno (Cohen e Karten, 1974).

O ouvido médio de aves possui apenas um ossículo, a columela, com duas extremidades especializadas: a extracolumela conectada à membrana timpânica e a parte basal que termina na janela oval da cóclea. Comparativamente, nos mamíferos têm-se três ossículos: o martelo, o estribo e a bigorna. Estes conduzem a pressão sonora do ouvido externo para o interno.

No ouvido interno das aves acredita-se que a cóclea funcione como dobradiça, com sua haste desempenhando papel de alavanca e transmitindo o estímulo mecânico de forma proporcional, em um processo análogo ao dos mamíferos. A cóclea das aves é dividida por estruturas cartilaginosas que sustentam a papila basilar, estrutura semelhante ao órgão de Corti em mamíferos (Cohen e Karten, 1974). Possui conformação aproximadamente em linha reta, distintamente da cóclea helicoidal dos mamíferos, com o comprimento da membrana basilar entre 2,5 mm (estorninho), 3,12 mm (pintos), 4mm (pombos) e 11 mm (corujas), menor portanto do que a dos mamíferos (18 a 33 mm). A localização das janelas oval e

redonda é ao longo do trajeto e não na porção basal terminal da cóclea, como se observa nos mamíferos. O helicotrema é menor ou ausente nas aves. Desta forma, a cóclea, embora pouco extensa, não sendo helicoidal e tendo um diminuto helicotrema, aumenta de modo relevante a probabilidade de deformação da membrana basilar. A função da cóclea também é otimizada pelo elevado número de células auditivas. Em uma seção transversal da terminação distal da cóclea há cerca de 54 células, enquanto nos mamíferos elas são em número de 4 ou 5.

A papila basilar, formada pela membrana basilar, tem de 6.000 a 10.000 células ciliadas sensoriais, distribuindo-se de forma mais densa na região apical, onde em cortes transversais pode-se encontrar 10 células na base e 50 no ápice, firmemente presas às células de suporte. Há três tipos de células ciliadas sensoriais, as altas, as curtas e um tipo intermediário que se encontra na zona de transição. Além da classificação anatômica, há vários argumentos que apoiam uma diferença funcional associada às variações anatômicas das células ciliadas. Por exemplo, o padrão de inervação das células é diferente e alguns canais iônicos são específicos para determinado tipo de célula (Murrow e Fuchs, 1990). As células ciliadas intermédias e curtas se localizam na parte superficial da membrana basilar e se movimentam mais livremente. Como em mamíferos, as células ciliadas das aves também se orientam para a membrana tectorial com os cílios voltados para o espaço subtectorial. O padrão de inervação da papila basilar ainda permanece mal definido, mas tem a presença de fibras aferentes e eferentes que são mielinizadas, incluindo as aferências das células ciliadas curtas e altas. Novamente verificamos uma diferença entre os mamíferos, onde as células ciliadas externas (semelhante as células ciliadas curtas em aves) não são mielinizadas. As fibras que partem das células ciliadas altas normalmente contactam duas destas células, pois elas pouco se ramificam; enquanto que as fibras aferentes das células ciliadas curtas contactam até 10 receptores. (Rebillard e Pujol, 1983; Whitehead e Morest, 1985; von During

et al., 1985). A inervação eferente é mais densa nas células ciliadas curtas. Na realidade a questão da semelhança das células ciliadas externas e internas em mamíferos e curtas e longas em aves ainda não está bem definida. Muitas questões sobre mecanismos funcionais das células ciliadas em aves ainda permanecem sem uma completa compreensão, como por exemplo, qual a real diferença funcional entre as células ciliadas curtas e longas e porque o grande número de células em um corte transversal.

As propriedades de resposta de fibras nervosas auditivas para todas as classes de vertebrados são muito similares, apesar da variabilidade morfológica de seus receptivos ouvidos internos. O ouvido interno das aves é a estrutura que mais se parece com o ouvido de mamíferos, tanto morfológica quanto funcionalmente. Ainda assim, eles se diferenciam substancialmente em relação às propriedades de condução do som, características morfológicas e densidade de inervação.

#### Eletrofisiologia das células ciliadas

A ativação da maioria das fibras aferentes da papila basilar de aves se dá por sons de frequências entre 30Hz a 6Khz, o que demonstra a baixa sensibilidade dos receptores para altas frequências. É sabido que algumas fibras da papila basilar não são ativadas por estímulos acústicos em uma faixa de frequência audível, mas são influenciadas por infra-sons (<20Hz), (Schemurly e Klinke, 1990). Estas fibras possuem uma atividade espontânea alta que é modulada por estes estímulos. A frequência característica das fibras aferentes de pombos pode ser influenciada pela temperatura do crânio. Com baixas temperaturas as frequências características apresentam valores menores, como demonstrado nos trabalhos de Schemurly e Klinke (1985).

#### Organização do Sistema Auditivo Central de Aves.



A via auditiva aferente em pombos é similar àquelas descritas em mamíferos (Correia et al., 1982). No entanto, na região apical da papila basilar há uma via sensorial secundária, a mácula lagenar, cujas fibras bifurcam-se e projetam-se tanto para o núcleo vestibular como para o complexo coclear (Necker, 1983). O nervo coclear se projeta para o complexo coclear, que é composto de duas subdivisões: o núcleo angular (NA) e o núcleo magnocelular (NM) do bulbo. O núcleo angular e magnocelular correspondem aos núcleos cocleares, sendo que o núcleo angular corresponde ao núcleo coclear dorsal de mamíferos e o núcleo magnocelular ao núcleo coclear ventral (Cohen e Karten, 1974).

Os impulsos da cóclea são transmitidos principalmente para o NA e NM do mesmo lado, seguindo pela oliva superior (OS) para formar o lemnisco lateral (LL). Correia et al. (1982); defendem a idéia de que a representação de vias auditivas aferentes é maior na oliva superior ipsilateral. Através do lemnisco lateral as fibras seguem ao núcleo mesencefálico lateral dorsal (MLd) contralateral. Outras fibras que não cruzam a linha média, seguem pelo lemnisco ao núcleo mesencefálico lateral dorsal ipsilateral (Correia et al., 1982). Em seus trabalhos, Conlee e Parks (1986), demonstraram que o NA envia uma extensiva, porém heterogênea, projeção bilateral para o núcleo central do MLd. As projeções ipsolaterais são menos densas e limitadas ao pólo rostromedial deste núcleo. O NA se projeta bilateralmente para a oliva superior, embora de forma mais densa ipsilateralmente; além disto, também envia suas fibras para o núcleo do lemnisco lateral parte ventral (LLv) contralateral e bilateralmente para o núcleo ventral do lemnisco lateral (VLV). A projeção contralateral para o VLV é mais extensa do que a ipsilateral e poucas fibras se dirigem ao núcleo dorsal contralateral do lemnisco lateral (LLd) (Conlee e Parks, 1986). O núcleo ventral do lemnisco lateral parte posterior (VLVp), mostra similariedade funcional ao núcleo olivar

superior lateral (LSO), e pela sua semelhança anatômica, ao núcleo dorsal do lemnisco lateral, quando comparado com estruturas centrais de mamíferos.

O núcleo laminar (NL), tido como homólogo do núcleo acessório medial da oliva superior de mamíferos, recebe projeções aferentes contralateral e ipsilateral da porção medial do núcleo magnocelular; também recebe projeções aferentes da margem ventromedial deste mesmo núcleo, e projeções que cruzam a rafe e terminam na parte ventromedial (Boord, 1969). A projeção aferente contralateral ao NL é mais densa que a ipsilateral. Com injeção de traçadores foi demonstrado que do núcleo laminar as fibras se projetam para o núcleo caudal do MLd contralateral, ipsilateralmente somente com a OS, e contralateralmente para o LLV e VLV (Conlee e Parks, 1986).

O mesencéfalo participa da via auditiva central como sede de núcleos que recebem uma série de projeções nervosas de estruturas centrais para o processamento do som, entre outras sensibilidades (somatosensoriais). Há numerosas projeções do corno dorsal da medula espinhal e do núcleo coclear para estruturas mesencefálicas, como a parte dorsal do MLd e NA, como previamente descrito (Wild, 1995).

O núcleo coclear tem conexões bilaterais para o mesencéfalo, sendo a maioria das projeções auditivas mesencefálicas proveniente do núcleo coclear contralateral. As conexões fornecem a excitação dominante observada no mesencéfalo por estímulo acústico contralateral, observado em aves, anfíbios e mamíferos (Conlee e Parks, 1986).

O MLd, principal centro auditivo mesencefálico de aves, é considerado homólogo ao colículo inferior de mamíferos (Cohen e Karten, 1974). Ele recebe projeções bilaterais do NA, NL, VLV, da OS, LLV e região lagenar que se situa na parte distal da papila basilar. Também recebe projeções contralaterais do MLd (Conlee e Parks, 1986; Correia et al., 1982). Além disto existem também conexões comissurais entre os MLds.

Do núcleo MLd as fibras seguem para o núcleo ovoidal ipsolateral do tálamo; algumas fibras aferentes cruzam a linha média na comissura supraóptica dorsal para terminar no núcleo ovoidal contralateral (Karten, 1968). O núcleo ovoidal do tálamo de aves é comparado ao corpo geniculado medial de mamíferos. Em pombos as aferências talâmicas auditivas terminam na região do neostriado. As fibras aferentes do núcleo talâmico seguem bilateralmente para o telencéfalo rostral terminando na porção medial do neostriado caudal, previamente designado de campo L por Rose (1914).

As aferências auditivas terminam na região caudomedial telencefálica (campo L) (Wild et al., 1993). Na verdade as fibras auditivas telencefálicas se concentram em três regiões separadas: o neostriado caudomedial (NCm), o neostriado caudal lateral (NCL) e o arquistriado intermédio. No neostriado caudomedial têm-se duas regiões no Campo L2, uma situada mais ventromedialmente designada de L2a e outra região menor, situada dorsolateralmente denominada L2b. Na região L2a chegam as aferências do núcleo ovoidal (Ov) e na região L2b chegam as aferências do núcleo semilunar paraovoidal (SPO), este último recebe aferências auditivas de um dos núcleos do lemnisco lateral e é responsável pela sensibilidade às baixas frequências, de acordo com Wild et al. (1993). Em aves o campo receptivo auditivo primário se refere ao campo L de Rose (Karten, 1968). O arquistriado tem uma região auditiva que contém neurônios que são sintonizados espacialmente e são altamente seletivos para localização do som com funcionamento similar às células do núcleo externo do colículo inferior e teto óptico em corujas (Cohen e Knudsen, 1994). O telencéfalo de aves, diferentemente da organização laminar de mamíferos, se caracteriza por um conjunto pequeno e denso de neurônios (Shimuzi et al., 1990). Em mamíferos as projeções auditivas corticais terminam na camada III e IV do córtex auditivo primário e são provenientes do

corpo geniculado medial, que é um núcleo auditivo talâmico. Em humanos o córtex auditivo corresponde as áreas 41 e 42 de Brodmann, localizado na face medial do lobo temporal.

### Organização Tonotópica do Sistema Auditivo de Aves.

A organização tonotópica se dá pela frequência característica (CF), ou seja, é a maior sensibilidade das fibras nervosas a uma determinada frequência, sendo esta melhor representada em determinada região ao longo da via auditiva central.

As propriedades de resposta das fibras nervosas auditivas observadas em aves e em mamíferos são muito similares (Manley, 1990). Em pombos, as fibras do nervo auditivo desenvolvem padrões de atividade semelhante àquelas observadas nos adultos 3 a 4 semanas após o nascimento; em pintos, os padrões de atividade se assemelham as do animal adulto já no nascimento (Richter et al., 1996). Contudo o mapa tonotópico da cóclea de aves para frequências características entre 100 e 1.700Hz amadurece e é relativamente estável do 19º dia embrionário (E19) até o 21º dia após o nascimento (P21). Para frequências características mais altas, até o E19 ainda se observam sinais de imaturidade (Jones e Jones, 1995).

Em mamíferos a membrana basilar (MB) é tonotopicamente mapeada com altas frequências melhor representadas na parte basal, e baixas frequências melhor representadas apicalmente, o mesmo ocorre com as aves. Assim a vibração de cada local da MB é mecanicamente sintonizada para certas frequências. A frequência característica ao ser mapeada tonotopicamente na papila basilar 30 a 70% distante do ápice e de 0 a 30% distante da base demonstrou que altas frequências são melhor representadas na base (4.000Hz) e baixas frequências no ápice (21Hz) (Smolders et al., 1995). Em outro experimento os mesmos autores obtiveram frequências características chegando a 6.000Hz e 20Hz. Na membrana basilar de aves a porção basal é rígida, a porção medial é mais elástica e a porção apical mais

flexível, criando um gradiente de elasticidade provavelmente responsável pelo deslocamento diferencial da membrana, em resposta aos sons de diferentes frequências (Konishi, 1973).

As fibras auditivas cocleares ou primárias preservam a sequência de ordem espacial de inervação sobre a membrana basilar na medida que elas trafegam do ouvido interno para a medula oblonga. No núcleo coclear elas terminam de uma forma sistemática, em neurônios dispostos de acordo com suas características de frequência.

Em um estudo desenvolvido por Richter et al. (1995) nas fibras auditivas aferentes primárias foi demonstrado que ao se apresentar estímulos de 10Hz a 10.000Hz com variação da intensidade de até 80dB a melhor frequência característica ocorreu entre 100 e 1.000Hz. Neste experimento ele verificou que o tipo da frequência característica não muda a taxa de disparo evocada em função da intensidade do estímulo sonoro, o que leva a crer que este comportamento das fibras pode estar associado à origem das fibras aferentes das células ciliadas e não unicamente à dinâmica da membrana basilar.

O núcleo angular demonstra com maior clareza uma organização tonotópica quando comparado ao núcleo magnocelular, representando as altas frequências em sua porção caudal e lateral. No núcleo magnocelular, a representação da frequência tonal aumenta em direção à porção rostromedial; desta forma, no terço rostromedial o núcleo tem respostas a altas frequências, no terço médio a frequências intermediárias e no terço caudal a baixas frequências (Konishi et al., 1988). A frequência decresce gradualmente em direção às áreas mais rostrais e mediais (Konishi et al., 1988). A magnitude de característica frequencial do NA supera em 2Khz a do NM (Yoerg, 1992). A tonotopia do núcleo magnocelular se reflete em sua projeção para o núcleo laminar onde áreas de altas frequências se localizam anteriormente e as de baixas frequências são representadas posterolateralmente (Takahashi e Konishi, 1988). De acordo com os estudos de Lippe e Rubel (1985) em pintos, a frequência

característica no NA e NL muda ao longo do eixo tonotópico posterolateral (baixas frequências) para anteromedial (altas frequências), ao longo do desenvolvimento ontogenético. No NL a representação foi em média 0,97 oitavas menor do que nos adultos, e no NM 1,03 a 0,3 oitavas abaixo das frequências representadas nos adultos. Os autores observaram um aumento sistemático na frequência característica durante o desenvolvimento em todas as posições ao longo do eixo tonotópico nas porções mais caudais do NM e NL. O mapa tonotópico não muda apicalmente, mas o limite da frequência característica pode se elevar com a maturidade (Jones e Jones, 1995).

Dos núcleos auditivos primários as fibras seguem para a porção posterior do núcleo ventral do lemnisco lateral (VLVp), que tem uma distribuição tonotópica ao longo da dimensão dorsoventral (Manley et al., 1988).

As fibras aferentes do lemnisco lateral se projetam para o núcleo mesencefálico lateral parte dorsal (MLd). Em corujas (*Tyto alba*), uma subdivisão do MLd (colículo inferior) é caracterizada por uma organização tonotópica, enquanto que em outra subdivisão o arranjo é feito de acordo com a localização do campo receptivo espacial da célula. A participação da via auditiva mesencefálica (MLd), se dá pela localização da fonte sonora, classificando as unidades do MLd de acordo com seu campo receptivo, que é dado pelo deslocamento da fonte sonora e pela frequência de resposta aos estímulos sonoros, demonstrando sua frequência característica (Knudsen e Knudsen, 1983). Segundo Knudsen e Konishi, (1978) o termo *campo receptivo*, se refere a área do espaço dentro do qual um estímulo sonoro pode influenciar a resposta de unidades auditivas. No núcleo MLd de corujas, as unidades neuronais estão arranjadas rigorosamente de acordo com sua frequência característica. Frequências baixas (500-700Hz) são representadas dorsomedialmente e

freqüências altas (acima de 6Khz) ventralmente, com lâminas de isofreqüências orientadas no plano horizontal (Knudsen e Konishi, 1978; Volman e Konishi, 1989).

No telencéfalo de aves ou no córtex auditivo primário e no de associação, existem mapas tonotópicos. Nestes mapas sons de altas e baixas freqüências excitam neurônios de extremidades opostas. Na maioria dos mapas a sensibilidade a sons de baixas freqüências se situa anteriormente e de altas freqüências, posteriormente. Estes mapas indicam que cada área analisa em separado algumas características específicas do som, tais como a discriminação das freqüências ou a localização do som.

De uma forma geral, podemos observar que a organização tonotópica originária da cóclea é preservada durante toda a via auditiva até o telencéfalo.

### **3. O Sistema Auditivo de Mamíferos.**

Em mamíferos as fibras nervosas do gânglio espiral de Corti vão aos núcleos cocleares (dorsal e ventral) na região superior do bulbo, onde todas as fibras fazem sinapse com neurônios de segunda ordem. Daí as fibras se projetam através do corpo trapezóide para o lado oposto do tronco, onde seguem ao núcleo olivar superior medial e lateral; as fibras que não cruzam dirigem-se ao núcleo olivar do mesmo lado. Seguindo pelo lemnisco lateral a maioria das fibras terminam no núcleo do lemnisco lateral e parte delas passam diretamente indo ao colículo inferior (mesencéfalo). O colículo inferior é o ponto de junção sináptica para praticamente todas as fibras auditivas. Do colículo inferior a via se dirige ao núcleo ou corpo geniculado medial (tálamo), onde ocorre nova retransmissão sináptica de todas as fibras, seguindo para o córtex auditivo, localizado em sua maior parte no giro superior do lobo

temporal. A informação proveniente dos sinais sonoros começa a ser dissecada em níveis cerebrais baixos (núcleos cocleares).

#### **4. Sensibilidade Interaural em Aves.**

A sensibilidade direcional pode ser definida como a propriedade do neurônio em responder em função do azimute no qual um estímulo acústico desencadeia uma resposta máxima (Middlebrooks e Knudsen, 1984).

Embora a localização do som tenha uma grande importância no comportamento das aves, a maioria dos estudos relacionados com mecanismos binaurais de orientação auditiva foram feitos em corujas (*Tyto alba*).

A seletividade neuronal para a localização da informação sonora não está presente no sistema auditivo periférico, mas em uma série de núcleos centrais (Konishi et al., 1988). O cérebro cria um mapa do espaço auditivo organizando a resposta neuronal pelas diferenças de tempos interaurais (ITD) e diferenças dos níveis interaurais (ILD) (Knudsen e Brainard, 1991), que variam com o azimute e a elevação da fonte sonora, respectivamente (Brainard et al., 1992; Moiseff e Konishi, 1981; Olsen et al., 1989). A diferença interaural do nível do som (ILD), é uma indicação importante para a localização da fonte sonora. Em aves o primeiro local com sensibilidade binaural está localizado na porção posterior do núcleo ventral do lemnisco lateral (VLVp), um grupo de células que recebem fibras do lemnisco lateral, (Modgans e Knudsen, 1993). Estes neurônios são excitados pela aferência do ouvido contralateral e inibidos pela aferência do ouvido ipsolateral, sendo portanto indicadores sensíveis da diferença do nível interaural. A excitação chega por via direta do núcleo angular contralateral, e a inibição é mediada por uma projeção comissural que interconecta o VLVp



pelos dois lados (Takahashi e Keller, 1992). Unidades neuronais dorsais do VLVp são mais fortemente inibidas quando o som é apresentado no ouvido ipsolateral em unidades mais ventrais. Já a responsividade de unidades do VLVp a estímulos excitatórios variam ao longo da sua dimensão dorsoventral (Manley, 1995). Sendo assim, tanto a mudança na força de inibição quanto a mudança no limiar da inibição contribuem para o gradiente dorsoventral de inibição do VLVp, o qual cria o mapa de sensibilidade à ILD. O VLVp das aves pela sua similaridade funcional é comparado ao núcleo olivar superior (LSO). Porém, o padrão das projeções excitatórias e inibitórias que convergem ao VLVp e ao LSO são opostas (Modgans e Knudsen, 1993). Modgans e Knudsen, (1995), sugerem que o gradiente da intensidade da inibição pode ser observado em parte, por uma diminuição na densidade das projeções.

O núcleo MLd em pombos (*Columba livia*) possui unidades neuronais com sensibilidade direcional que sintonizam para baixas frequências e são sensíveis exclusivamente ao ITD ou ao ITD e ILD. Também têm unidades que respondem a altas frequências e que são sensíveis ao ILD somente e não ao ITD (Lewald, 1990). Em corujas, o núcleo MLd apresenta duas regiões anatômicas funcionalmente distintas, o que não ocorre em pombos de forma tão clara. O núcleo MLd de pombos é comparativamente menor, e em alguns casos há um gradiente significativo de topografia azimutal ao longo do seu eixo rostrocaudal para os neurônios sensíveis a baixas frequências (Lewald, 1990). O mesmo autor mostrou que tanto o ITD como o ILD são responsáveis pela sensibilidade direcional no mesencéfalo.

É importante mencionar ainda que existe uma via de transmissão sonora interaural. As frequências inferiores a 250Hz são atenuadas de 25 a 35dB na membrana timpânica contralateral, medida no ouvido médio. A diferença do nível de pressão sonora (SPL) interaural contralateral e ipsolateral representa o aumento na intensidade do som no

ouvido contralateral necessário para induzir uma estimulação na cóclea capaz de produzir uma resposta semelhante a uma determinada estimulação ipsolateral. Com o aumento da frequência do estímulo a diferença no SPL diminui para 10-15dB, de acordo com os estudos demonstrados por Rosowski e Saunders, (1980). Assim sendo, a oclusão monaural não significa que um estímulo possa levar a uma resposta essencialmente monaural quando assim estimulado.

## **5. Atividade Espontânea das Fibras Auditivas.**

As propriedades das respostas das fibras nervosas auditivas para todas as classes de vertebrados são muito similares, apesar da variabilidade morfológica de seus respectivos ouvidos internos. De acordo com Lippe (1994), os neurônios sensoriais respondem ao estímulo sonoro com a modificação da frequência e do padrão de atividade. Muitos neurônios são ativos na ausência de um estímulo sensorial presente, sendo a atividade espontânea (AE) de unidades de primeira e segunda ordem atribuída a uma liberação basal de neurotransmissores nas sinapses das fibras nervosas auditivas com as células ciliadas. Lippe (1994) verificou o padrão de atividade espontânea de fibras embrionárias de multiunidades no MN e NL, núcleos de segunda e terceira ordem no sistema auditivo de aves, respectivamente. Neste estudo concluiu que o padrão temporal da atividade espontânea de unidades e multiunidades muda durante o desenvolvimento embrionário de pintos, alcançando um padrão que se mantém a partir do 19º dia (E19) até após o nascimento, da mesma forma que ocorre com a tonotopia.

A atividade espontânea (AE) de neurônios auditivos primários em todos os vertebrados terrestres é caracterizada por sua natureza irregular. De acordo com Manley

(1990) e Shermuly e Klinke, (1990) as fibras auditivas de pombos mostram estas irregularidades, apresentando uma atividade espontânea média de 90Hz que oscila entre 20hz e 200Hz, contrastando com neurônios vestibulares (Manley, 1979). A AE média das fibras auditivas aferentes em aves possui uma distribuição monomodal. Em mamíferos e outros vertebrados esta distribuição é bimodal, com a presença tanto de fibras com atividade espontâneas altas como baixas (Klinke e Smolders, 1993).

O gânglio coclear do pombo tem neurônios sensíveis a frequências sonoras abaixo de 20Hz (infra-sons) como já foi visto anteriormente, e estes neurônios são caracterizados por uma AE alta e um ritmo irregular de  $114,8 \pm 24,7\text{Hz}$  (Shermuly e Klinke, 1990). A AE é muito reduzida em fibras com respostas a altas frequências.

Da mesma forma que o padrão de atividade neuronal em pombos adultos é aquele considerado quatro semanas de vida pós-natal, a atividade espontânea das fibras em animais imaturos (cerca de 40Hz) é aproximadamente metade daquelas dos adultos que é em média de 93Hz (Richter et al., 1996). Observa-se desta forma que a AE das fibras auditivas em aves tem uma frequência média irregular após a maturidade, e que é relativamente alta.

## **6. Integração das Vias Sensoriais.**

A percepção de estímulos complexos requer uma integração das vias sensoriais (Knudsen e Brainard, 1995). As vias auditiva e visual desempenham funções específicas. Apesar disto, a convergência de sinais a nível central possibilita esta integração, como pode ser observado no teto óptico de aves, ricos em neurônios com respostas bimodais (Brainard e Knudsen, 1993). No tálamo de pombos da espécie há um grande número de neurônios sensíveis aos estímulos auditivos e visuais. O núcleo dorsolateral posterior (DLP) possui 40%

das células respondendo intensamente a estímulos bimodais visuais e auditivos, enquanto que 7% dos neurônios do núcleo dorsal intermédio ventral anterior (DIVA) possui além destas sensibilidades, também as somatosensoriais, revelando-se um importante integrador de vias sensoriais centrais (Schneider e Necker, 1996).

A topografia de uma determinada via sensorial pode ser ativamente guiada pela informação fornecida através de uma outra fonte sensorial (Brainard e Knudsen, 1993). Foi demonstrado por estes autores que ao submeterem corujas a uma visão prismática que deslocava o campo visual, induziram um deslocamento da representação auditiva do meio ambiente no tecto óptico e no núcleo externo do colículo inferior. Esta combinação resulta em parte da plasticidade notável da sintonização espacial auditiva dos neurônios tectais. O mapa do espaço visual do cérebro deriva de uma projecção ponto a ponto da retina; em contraste, o cérebro constrói o mapa do espaço auditivo organizando sistematicamente os neurônios conforme sua sintonização para fontes de localização sonora, tais como as diferenças interaurais no tempo e na intensidade. (Knudsen e Brainard, 1991).

Em resumo, nesta breve revisão do sistema auditivo de aves procuramos demonstrar a via auditiva clássica, e os órgãos periféricos, indicando que estas estruturas apresentam características morfológicas, hodológicas e funcionais específicas, mas homólogas às dos mamíferos. Os estudos comparativos freqüentemente nos levam a princípios gerais da organização neural entre as diversas espécies, fornecendo informações sobre a evolução do sistema nervoso e sobre mecanismos básicos de seu funcionamento.

## 7. Considerações Anatômicas Gerais.

A região anatômica de interesse desta pesquisa tem o mesencéfalo como uma estrutura cerebral envolvida com o sistema somatosensorial e motor, e desta forma objeto de estudo da maior importância. Passam pelo mesencéfalo projeções do sistema auditivo, visual e somatosensorial. Outro fator importante é a presença de trato de fibras ascendentes e descendentes que passam pela região. O mesencéfalo também contém vários núcleos que controlam a distribuição de certos neurotransmissores para outras regiões do cérebro envolvendo três regiões: área tectal, tegumentum e o istmo. A área tectal contém estruturas como o tecto óptico (colículo superior em mamíferos) relacionado com projeções visuais; e o torus semicircular, relacionado com projeções auditivas, que se originam do lemnisco lateral. O tecto óptico (aves) tem uma importante função no comportamento visuomotor, estando envolvido na orientação para estímulo visual pelo movimento da cabeça e/ou dos olhos (sacádico: que é o movimento do olhar rápido dirigido), (Butler et al., 1996).

Na transição do mesencéfalo e diencéfalo, têm-se estruturas como o tubérculo posterior e o pretecto que recebe aferências da retina e do tecto óptico e está envolvido na modulação do comportamento motor em resposta a projeções visuais. O sistema óptico acessório, que anatômicamente não é um núcleo do pretecto, mas se assemelha a este funcionalmente, está envolvido com a regulação dos movimentos dos olhos em relação ao campo visual, chamado nistagmo optocinético (OKN). O núcleo da raiz óptica basal (nBor), em aves denominado também de núcleo ectomamilar (EM), está presente na parte lateral do tegumento em répteis (Butler et al., 1996).

Ao nível do telencéfalo, encontra-se o trato quíntofrontal que se origina na ponte e termina na parte basal frontal do telencéfalo, numa região conhecida como núcleo

basal, participando como uma via somatosensorial. Outra estrutura telencefálica, a amígdala, faz parte do sistema límbico (comportamento social). Em aves, três núcleos são homólogos à amígdala de mamíferos: o arquistriado medial, arquistriado posterior e núcleo taeniae. O núcleo amígdalar do arquistriado se projeta para o hipotálamo via trato occipitomesencefálico. O telencéfalo ventromedial em mamíferos contém o gânglio basal que é formado por três núcleos: o núcleo caudato, núcleo putâmico e o globo pálido. O globo pálido corresponde em aves ao paleoestriado primitivo. Do segmento interno do globo pálido saem fibras que passam pela alça lenticular, que está envolvida com o sistema motor, indo até o tálamo dorsal passando pela zona incerta. A alça lenticular se situa próximo ao núcleo subtalâmico e se conecta reciprocamente com ele. O globo pálido recebe projeções também da amígdala (Butler et al., 1996).

### **Justificativa.**

Levando-se em consideração as vias auditivas clássicas comentadas anteriormente, passa a ser interessante observarmos o comportamento de unidades sensíveis a estimulação sonora encontrados em locais ainda não mencionados.

De acordo com a literatura foi possível verificar que a maioria dos estudos relacionados com eletrofisiologia das células auditivas em pombos são desenvolvidos a nível bulbar, com núcleos de primeira e segunda ordem. O telencéfalo e mesencéfalo (colículo inferior) é muito estudado em corujas. No entanto, percebe-se que há uma escassez na literatura no que se refere a eletrofisiologia de unidades celulares mesencefálicas em pombos. A via auditiva no mesencéfalo conta com o MLd como um núcleo que faz parte da via auditiva clássica. Entretanto, poderá haver no mesencéfalo e em sua proximidade, fibras com

sensibilidade auditiva, sendo elas fibras de passagem ou até mesmo pertencentes a um núcleo de retransmissão. A hipótese da existência de fibras com características eletrofisiológicas com comportamento semelhante ou não, de outros núcleos ou fibras auditivas, torna interessante o desenvolvimento da presente pesquisa.

A via auditiva central é povoada por neurônios sensíveis a faixas específicas de frequências e intensidades de estímulos sonoros, permitindo a discriminação das características do som e sua localização no espaço. Contudo, em nossos experimentos anteriores encontramos neurônios com sensibilidade sonora que não se localizam nas vias auditivas clássicas, passando a ser interessante sua caracterização funcional assim como sua localização.

## **Objetivos.**

### **1. Objetivo Geral.**

Em nosso trabalho procuramos investigar a existência de células com resposta a estímulos auditivos na região mesencefálica de pombos *Columba livia*.

### **2. Objetivos específicos.**

2.1. Localização anatômica das unidades eletrofisiologicamente registradas.

2.2. Analisar as diferentes respostas entre os estímulos acústicos binaurais e monaurais.

2.3. Determinar a frequência característica das células.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Preparação

#### Animais

Foram utilizados 25 pombos domésticos (*Columba livia*), adultos, de ambos os sexos, pesando entre 350 e 450 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram anestesiados com Uretana (1,2g/ kg i.p.) com um suplemento horário de 0,1 ml (solução 40%) durante todo o experimento.

#### Eletrodos

Foram utilizados eletrodos de tungstênio ou aço inoxidável afilados eletroliticamente em solução saturada de hidróxido de sódio e de ácido sulfúrico 20%, respectivamente. A base de cada filamento foi comprimida em um segmento de aproximadamente 1 cm de agulha hipodérmica para melhorar a fixação no aparelho estereotáxico. Para isolamento elétrico os eletrodos receberam de 7 a 8 banhos de verniz eletroisolante, onde após cada banho foram colocados para secar em estufa à temperatura de 85 ° C por 30 minutos. Exceção foi feita após o último banho, quando permaneceram



por 12 a 15 horas a 120° C. Desta maneira obtivemos um eletrodo com 5µm de metal livre de isolamento.

## **2. Estereotaxia**

Os animais foram mantidos em um aparelho estereotático (KARTEN & HODOS, 1967) com a cabeça presa a uma haste de metal, com um orifício central para acesso do eletrodo ao sistema nervoso central e fixada através de acrílico na parte superior do crânio. Este procedimento permitiu a liberação do conduto auditivo das barras interaurais do estereotático.

Para a penetração do eletrodo foi promovida uma abertura de aproximadamente 5 mm no crânio dos animais, usando-se broca odontológica esférica.

## **3. Aquisição de dados**

Os eletrodos foram estereotaxicamente colocados nas coordenadas 4,5 anterior, 1,5 lateral e 4,3 de profundidade segundo atlas estereotático de pombos (KARTEN & HODOS, 1967). A partir destas coordenadas procuramos com passos de décimos de milímetros as unidades celulares com características próprias de nBOR (núcleo da raiz óptica basal), ou seja, alta sensibilidade ao deslocamento amplo de campos visuais. Em seguida, explorando os limites anteriores, laterais e dorsais do nBOR procuramos localizar os neurônios sensíveis a estímulos auditivos.

Toda atividade neuronal foi obtida através de registros eletrofisiológicos unitário ou multiunitário extracelular. Na maioria das vezes o registro foi multiunitário pela dificuldade de se isolar os potenciais, provavelmente por se originarem de fibras ou

neurônios com corpos celulares reduzidos ou com alta densidade celular. A aquisição dos sinais eletrofisiológicos das atividades neuronais deflagradas e da atividade espontânea foi feita através de um amplificador de alta impedância e outro de baixa impedância (ORTEC 4660 e TEKTRONIX ® AM 502 respectivamente) que permitiu a amplificação e filtragem dos sinais. Os sinais amplificados e filtrados foram monitorados visualmente em um osciloscópio digital ( OSCILOSCOPE (DSO) 420, da marca GOULD) e auditivamente após conversão da atividade eletrofisiológica em sinais de audio.

Uma derivação dos sinais foi conduzida a um analisador de amplitudes que possibilitou a seleção de potenciais. Os sinais do analisador de amplitudes foram transferidos para um computador que criou arquivos dos intervalos entre os potenciais. A análise dos dados foi feita com o uso do mesmo programa de aquisição, desenvolvido em nosso laboratório.

#### **4. Estimulação auditiva**

A presença das células auditivas foi inicialmente detectada pela geração de um ruído. Fones de ouvido (Sony) para estimulação foram posicionados a 0,5 cm da abertura do meato acústico externo de ambos os ouvidos dos animais, este arranjo permitiu uma menor interferência de ruídos sonoros externos, correspondendo a uma resposta celular mais diretamente associada aos estímulos sonoros gerados. A estimulação acústica foi deflagrada por um sistema multimídia (WAVEDIT) com a possibilidade da escolha das características do som quanto a intensidade e frequência. Os arquivos foram feitos de maneira a garantir a mesma intensidade de estimulação nas diferentes frequências apresentadas. Para isto, o nível de estimulação foi previamente medido em um

osciloscópio associado a um decibelímetro (MINIPA - MSL - 1350) e as compensações foram feitas na gravação dos arquivos.

Os estímulos apresentados na forma de tons puros compreenderam frequências de 100 a 10.000Hz divididos em 8 (oito) categorias: 100, 300, 500, 700, 1.000, 5.000, 7.000, 10.000Hz. Antes dos tons puros foi apresentado um ruído com frequência média de 440Hz em cada aquisição. Cada estímulo, com duração de 3 segundos, foi antecedido por um período de 3 segundos de silêncio, para evitar uma possível habituação, totalizando um arquivo de 54 (cinquenta e quatro) segundos.

Cada animal foi estimulado com ruído e tons puros nos ouvidos direito e/ou esquerdo por duas vezes, para possibilitar uma média dos arquivos, minimizando possíveis oscilações induzidas por ruídos externos ou para que os movimentos respiratórios do próprio animal não interferissem na análise da atividade celular. Desta forma, uma mesma célula foi registrada seis vezes: com as estimulações binaural, monaural ipsolateral e monaural contralateral.

## **5. Análise histológica.**

Para determinar a localização histológica das unidades registradas os eletrodos foram posicionados nas coordenadas em que houveram melhores respostas a estímulos auditivos durante o experimento e se promoveu a demarcação do local através de uma lesão eletrolítica, com passagem de corrente elétrica de 5 mA com duração de 2 segundos.

Ao final do experimento os animais receberam um suplemento de anestesia e foram perfundidos (intracardiamente) com solução salina (NaCl 0,9%), seguido de

perfusão com solução de paraformaldeído a 4 % (PFA). Foram então decapitados e o cérebro foi removido e mantido em sacarose até serem laminados em cortes de 30 micra pelo método criostático. As peças foram coradas usando-se a técnica de Nissl.

## 6. Análise dos dados.

Inicialmente foram estabelecidas as coordenadas médias das unidades responsivas aos estímulos sonoros de acordo com o zero (O) interaural e o plano sagital.

A atividade neuronal adquirida foi analisada sob diferentes aspectos. De início, quanto a sua atividade espontânea (AE), ou seja, a atividade da célula na ausência de um estímulo. Outra análise feita foi quanto a atividade provocada, que corresponde a frequência de resposta da célula a partir da atividade espontânea, ou seja, atividade total provocada (AP) menos a atividade espontânea (AE), resultando em: **Atividade provocada = AP - AE**. Desta forma foi possível observar o aumento da atividade da célula a partir da atividade espontânea.

Para o cálculo da variação da resposta neuronal sob diferentes características da estimulação auditiva, foi considerado como ganho (G) o incremento da atividade celular. Desta maneira o ganho está associado a frequência da atividade espontânea (AE) imediatamente anterior ao estímulo e à frequência da atividade deflagrada sob estimulação provocada (AP), relacionados na fórmula:  **$G = (AP - AE) / AE$** .

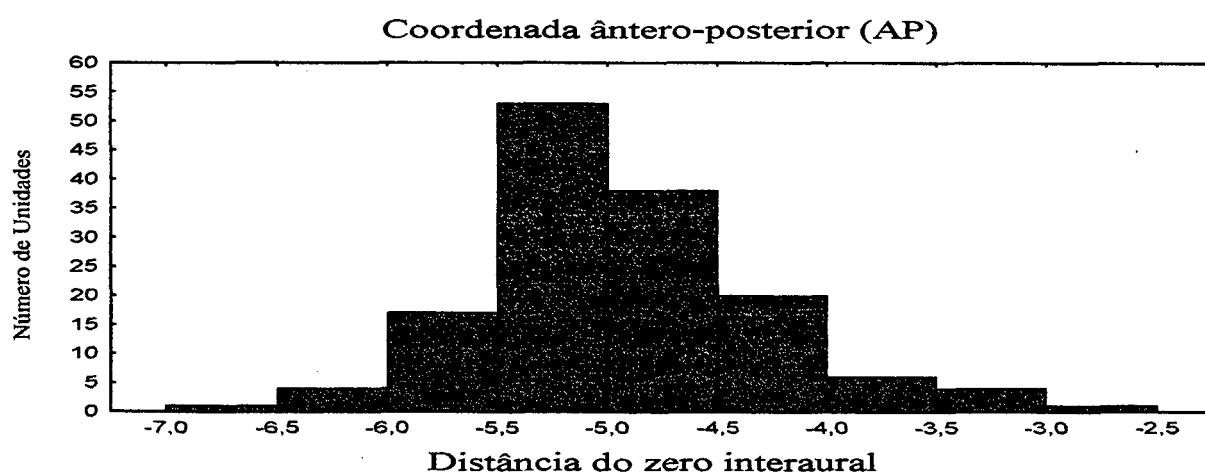
Por último, analisamos a atividade neuronal considerando a frequência da resposta na apresentação de um estímulo.

Foram utilizados a análise de variância (ANOVA/MANOVA), teste de comparação entre médias (DUNCAN) e o Teste T. O nível de significância aceito foi de 0,05.

### III - RESULTADOS

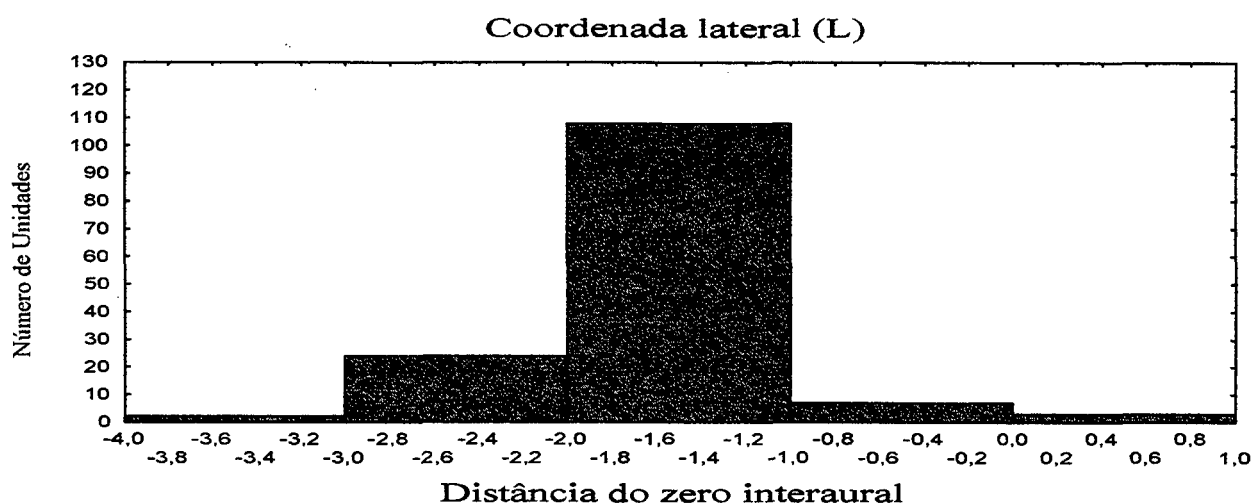
#### 1. Localização

Dos experimentos realizados em 24 aves foram identificadas 145 (cento e quarenta e cinco) unidades celulares. Suas coordenadas estereotáticas foram tomadas em relação ao zero (0) interaural, para o cálculo da extensão e ponto médio de sua distribuição (figuras 1,2 e 3). As coordenadas determinadas foram ântero-posterior (AP), lateral (L) e altura (A).



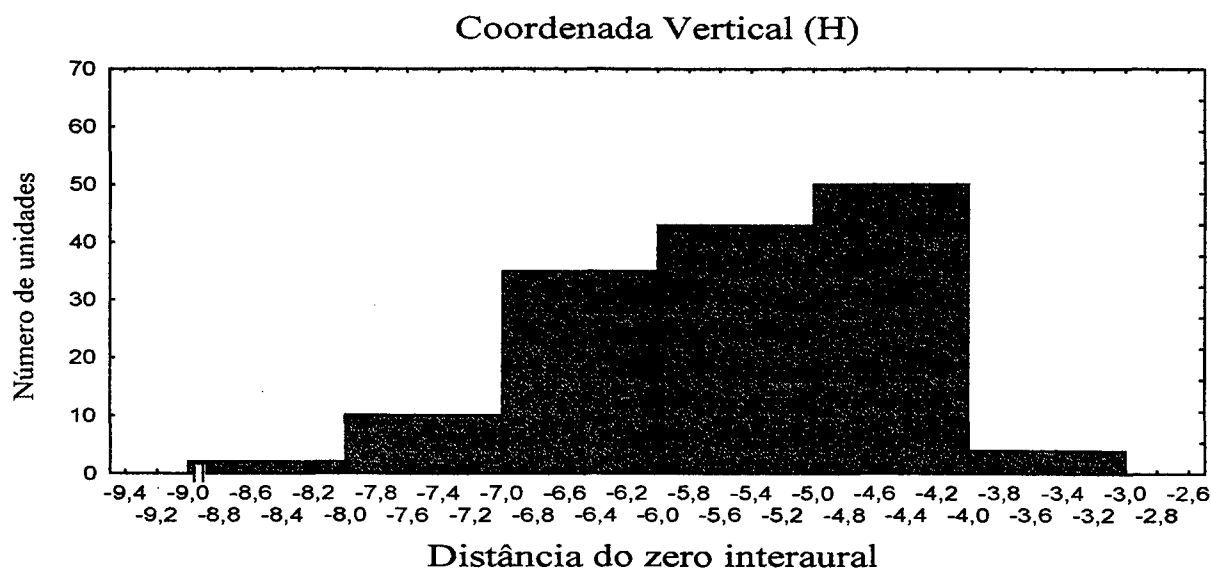
**Figura 1** - Frequência de distribuição da localização das células auditivas registradas nas coordenadas ântero-posterior (AP) com relação ao O (zero) interaural.

O gráfico da figura 1 demonstra uma prevalência da distribuição no eixo ântero-posterior entre 4,0 a 6,0mm anterior, com relação ao O interaural. Percebe-se entretanto, que a maior porcentagem (aproximadamente 59%) das unidades encontradas se localizam entre as coordenadas 4,5 e 5,5mm.



**Figura 2** - Frequência de distribuição das unidades auditivas na coordenada lateral (L) com relação a linha média (sagital).

A análise da distribuição das células auditivas no eixo lateral observado na Figura 2, demonstra uma frequência de distribuição maior entre 1,0 a 2,0mm médio-lateral, considerando-se a linha média (sagital). No entanto percebe-se que foram encontradas unidades com características de células auditivas até 3,0mm lateralmente à linha média. Também foram encontradas unidades com as mesmas características localizadas mais medialmente, se projetando sobre a linha média.

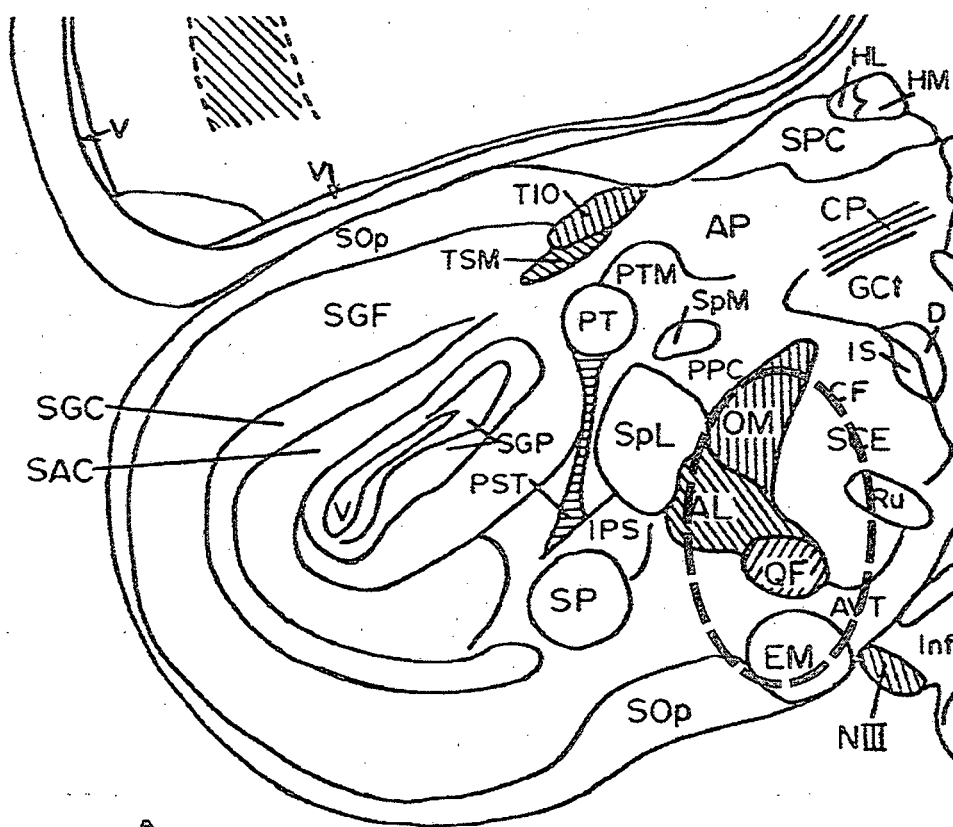
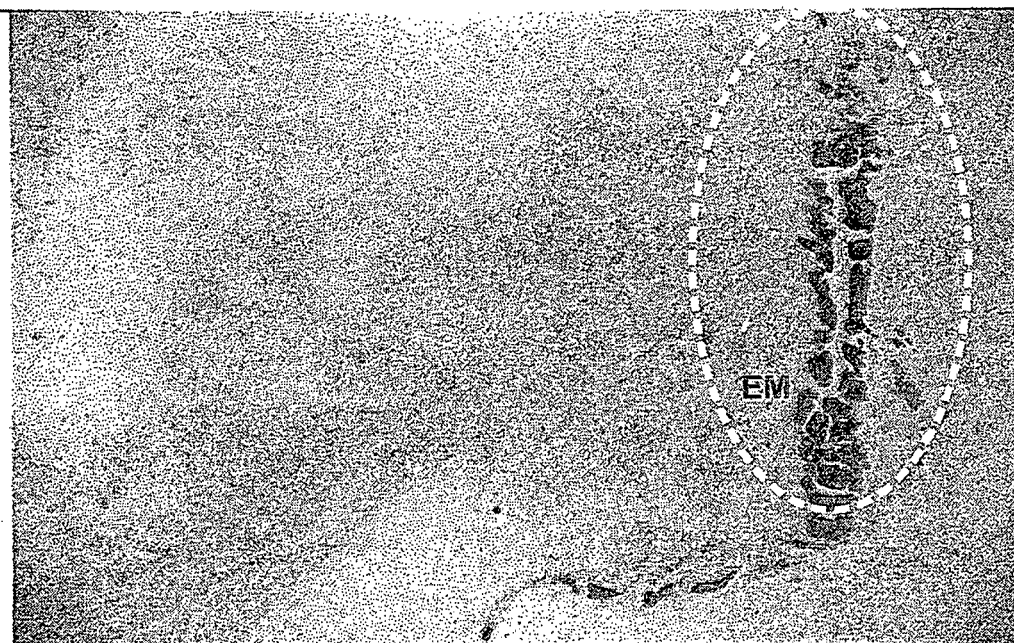


**Figura 3** - Frequência de distribuição da localização das células registradas no eixo vertical infero-superior, na coordenada altura (H) das células auditivas com relação ao O (zero) interaural.

A figura 3 demonstra a frequência de distribuição no eixo infero-superior (H), onde se verifica um predomínio da localização entre 4,0 a 7,0mm do zero interaural (aproximadamente 80% das unidades).

Como demonstrou-se anteriormente, não se pode definir uma região cerebral específica de localização das unidades celulares com características auditivas. De acordo com o atlas estereotático de Karten & Hodos (1967), observa-se que as unidades se distribuem na região mesencefálica em sua maioria e em menor proporção na região diencefálica (Figura 4), circundando estruturas como o trato quintofrontal (QF); alça lenticular (AL); núcleo ectomamilar (EM) ou núcleo da Raiz Óptica Basal (nBOR) e o estrato celular externo (SCE).





**Figura 4.** Verificação histológica da área de registros. Secção transversal do mesencéfalo no cérebro de pombos, mostrando a localização da lesão e do trajeto do eletrodo. A lesão na região medial se localiza entre a alça lenticular (AL), trato quintofrontal (QF) e núcleo ectomamilar (EM) e se situa na área pontilhada.

## 2. Atividade Celular

Uma vez obtidas as coordenadas de distribuição das células auditivas, prosseguiu-se o registro eletrofisiológico. Consideramos registros celulares unitários e multiunitários, visto que o isolamento dos potenciais destes neurônios foi dificultado provavelmente por terem dimensões celulares reduzidas ou alta densidade celular. Sendo assim, na maioria das vezes os registros foram multiunitários.

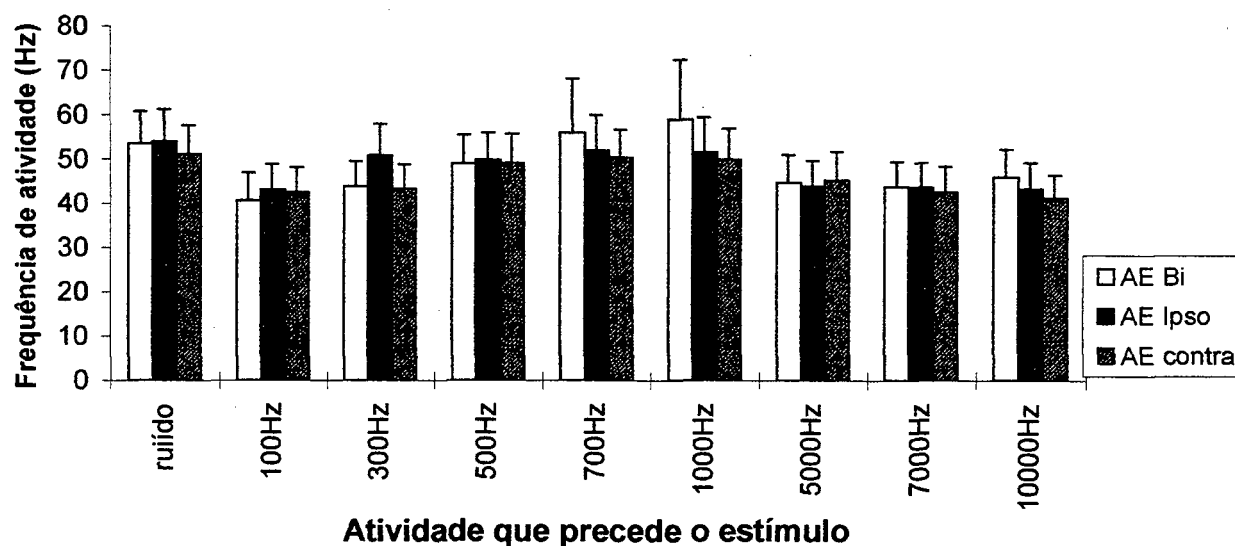
Do total das células registradas, 25 (vinte e cinco) foram analisadas eletrofisiologicamente quanto a discriminação tonal, ou seja, sua atividade de resposta na apresentação de uma frequência sonora.

Uma vez posicionado o eletrodo um estímulo sonoro foi aplicado para confirmar a localização eletrofisiológica característica das células neuronais em estudo, observando-se o padrão da atividade de resposta.

De acordo com a metodologia descrita anteriormente optamos por analisar separadamente a atividade neuronal sob diferentes aspectos. Inicialmente foi observada a atividade espontânea da célula em estudo, considerando que o ambiente do experimento ou a sala de registro possuía um nível de ruído de aproximadamente 65 dB. Durante todo o experimento a atividade espontânea pode ser verificada nos 3 (três) segundos que precederam a apresentação de cada estímulo.

Foram analisados 25 registros de atividade espontânea (AE) de células com sensibilidade auditiva que revelaram uma frequência média de 47,4Hz com uma pequena variação; 41,2Hz como a menor e 59Hz como a maior frequência observada, independente do lado estimulado, binaural, ipsilateral ou contralateral ao local do registro. As unidades neuronais em estudo revelaram uma alta atividade espontânea. Ficou demonstrado que

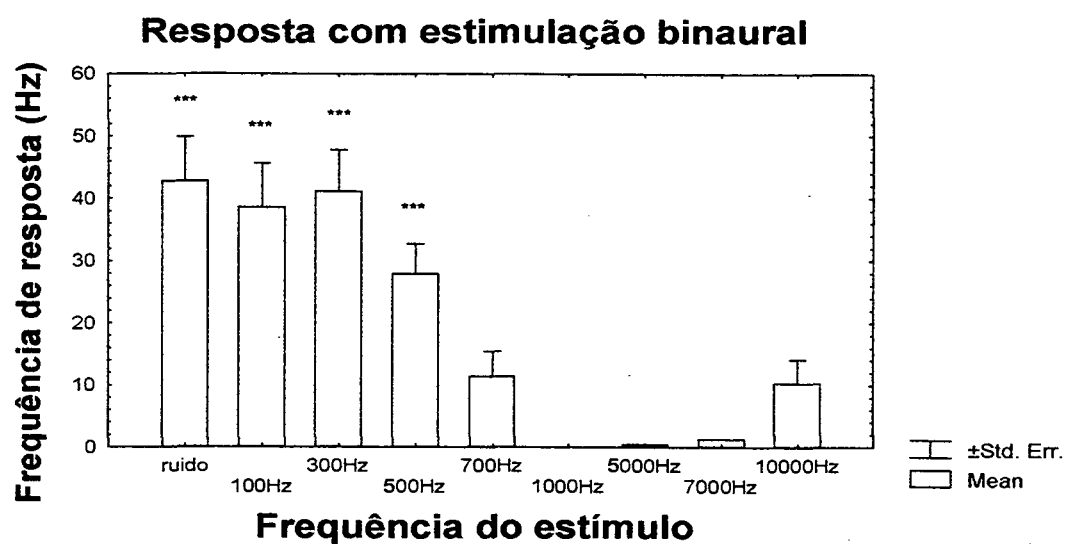
durante toda a fase de experimentação não houve variação estatisticamente significativa da atividade espontânea (AE) conforme mostra a figura 5.



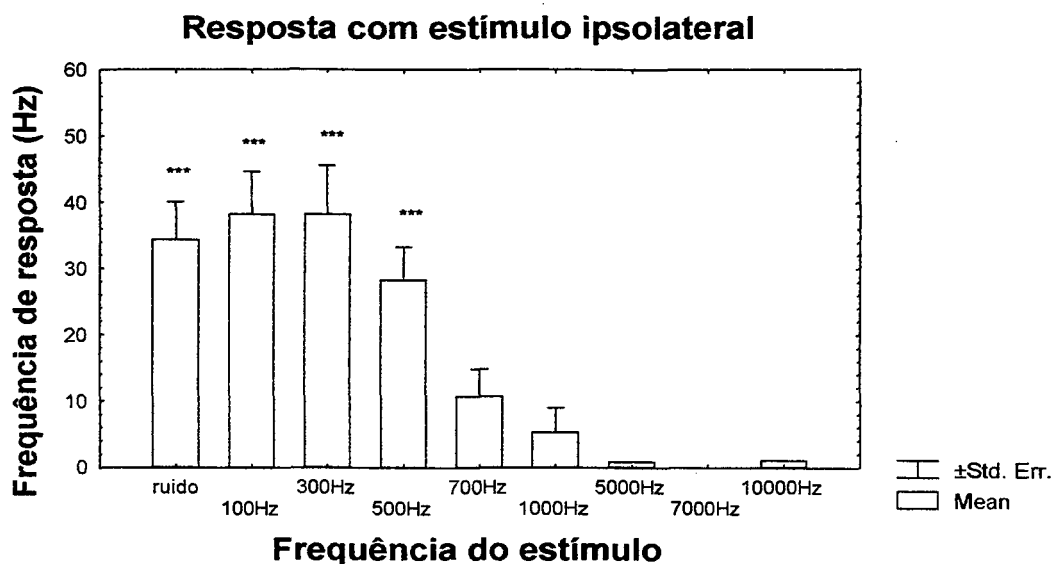
**Figura 5** - Frequência da atividade espontânea imediatamente anterior aos estímulos provocados binaural, contralateral e ipsolateralmente ao lado registrado. Não foi encontrada diferença estatística quanto ao lado estimulado (ANOVA,  $p=0,93$ ).

Foram analisados 25 (vinte e cinco) registros sob estimulação com ruído, com frequência média de 440Hz, e tons puros de 100 a 10.000Hz. Consideramos um intervalo de 3 (três) segundos entre a apresentação dos estímulos para descaracterizar uma possível habituação.

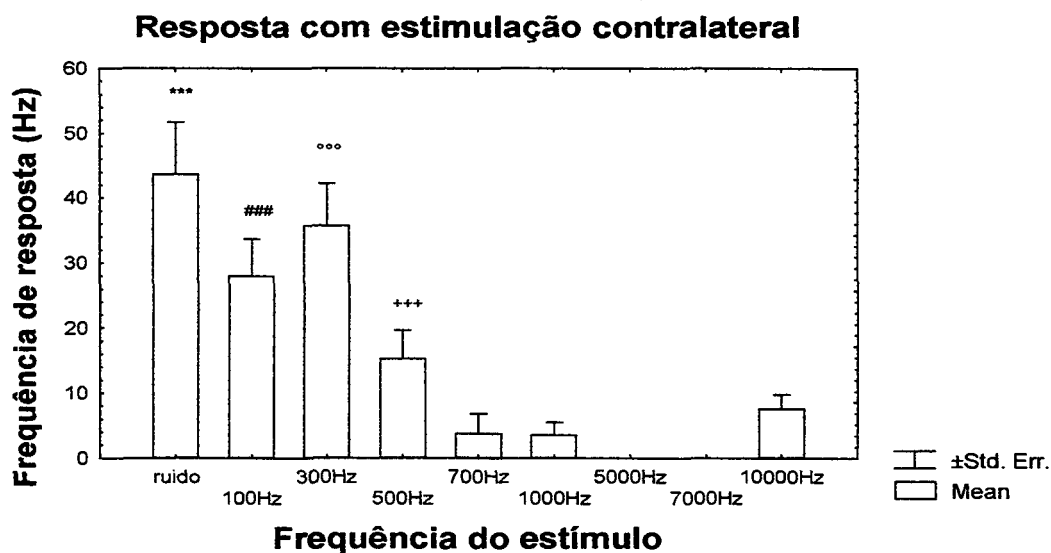
No tratamento das respostas verificamos alterações significativas quando da variação da frequência do estímulo sonoro como demonstraremos abaixo.



**Figura 6** - Frequência de resposta com estimulação binaural. (\*\*\*) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos estímulos entre 700Hz e 10.000Hz (  $F(df1,2) = 9,441$  Rao R (27,1282) =6,27;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 7** - Frequência de resposta com estimulação ipsolateral. (\*\*\*) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos estímulos entre 700Hz a 10.000Hz. ( $F(df1,2)=9,441$  Rao R ( 27,1282) = 6,27;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 8** - Frequência da resposta com estimulação contralateral ao local do registro. (\*\*\*) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos estímulos de 100Hz e 500Hz até 10.000Hz. (###) indicam diferenças com apresentação de ruído e frequências de 500Hz a 10.000Hz. (°°°) indicam diferenças estatisticamente significantes com relação às frequências de 500Hz a 10.000Hz. (+++) indicam diferenças com a apresentação de ruído e frequências de 100Hz, 300Hz, 5.000Hz e 7.000Hz. ( $F(df1,2)=9,441$  Rao R ( 27,1282) = 6,27;  $p < 0,0001$ ).

As figuras 6,7 e 8 demonstram que a apresentação de ruído desencadeou uma resposta com atividade média superior às respostas com frequências de estimulação de 100, 300 e 500Hz, não sendo, todavia, estatisticamente significantes nesta diferença. Atribuímos a resposta diferenciada do ruído a sua natureza e consideramos que no habitat natural do pombo este tipo de estímulo é tido como o mais habitual, apesar da grande habilidade das aves em selecionar um tipo de som entre muitos. Este fato pode caracterizar a ausência da diferença estatística entre ruído e sons de baixas frequências.

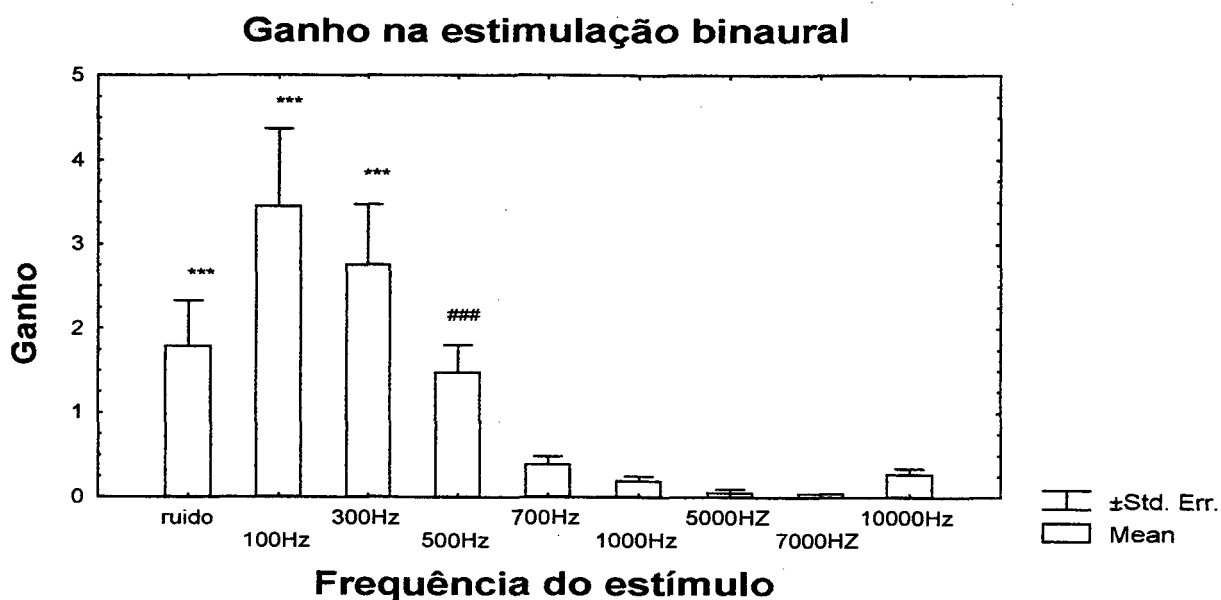
A frequência de resposta observada quando no tratamento dos dados, demonstrou de acordo com os gráficos e teste estatístico anteriormente apresentados e os que se seguem, que baixas frequências de estímulo tais como ruído e frequências de 100 a 500Hz apresentam uma melhor frequência de resposta. De um modo geral, observa-se a preferência das unidades registradas a estímulos sonoros de baixas frequências.

Observando-se a tabela 1, é possível verificar a frequência de resposta das unidades auditivas registradas (AP) bem como sua atividade espontânea (AE) cada qual demonstrando seu erro padrão.

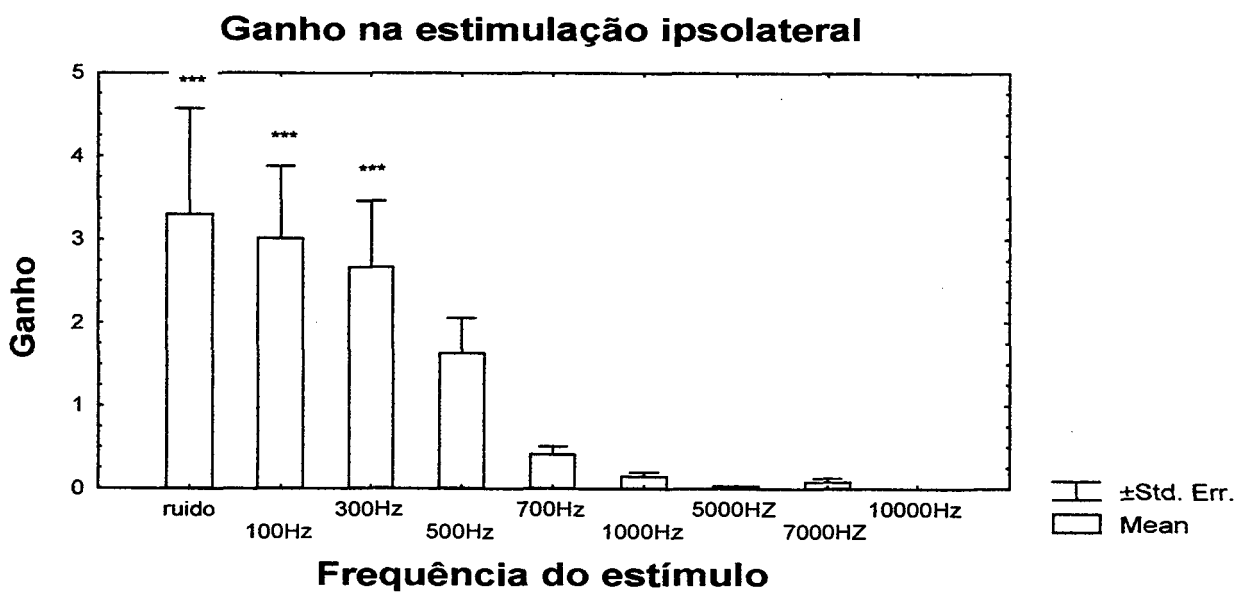
**Tabela 1.** Frequência média em Hz ( $\pm$  E.P.M.) da atividade espontânea e de resposta em função do lado estimulado dada em Hz.

Grupo	Binaural		ipsolater		contralat	
	AE	AP	AE	AP	AE	AP
Ruído	53,60( $\pm$ 7,11)	87,4( $\pm$ 11,21)	53,94( $\pm$ 7,34)	79,3( $\pm$ 7,72)	51,12( $\pm$ 6,57)	86,2( $\pm$ 11,78)
100Hz	40,60( $\pm$ 6,26)	79,2( $\pm$ 7,95)	43,12( $\pm$ 5,69)	81,3( $\pm$ 8,47)	42,47( $\pm$ 5,65)	70,4( $\pm$ 6,26)
300Hz	43,82( $\pm$ 5,70)	84,9( $\pm$ 8,04)	50,87( $\pm$ 7,11)	89( $\pm$ 8,86)	43,39( $\pm$ 5,42)	79( $\pm$ 7,58)
500Hz	48,86( $\pm$ 6,56)	76,8( $\pm$ 7,96)	49,73( $\pm$ 6,25)	78( $\pm$ 7,85)	49,06( $\pm$ 6,64)	64,3( $\pm$ 6,56)
700Hz	55,92( $\pm$ 12,22)	67,4( $\pm$ 15,26)	52( $\pm$ 7,86)	62,6( $\pm$ 8,68)	50,38( $\pm$ 6,25)	54,2( $\pm$ 6,69)
1000Hz	59,07( $\pm$ 13,35)	57,6( $\pm$ 8,83)	51,66( $\pm$ 7,71)	56,9( $\pm$ 9,28)	49,88( $\pm$ 7,05)	53,3( $\pm$ 7,52)
5000Hz	44,66( $\pm$ 6,30)	45( $\pm$ 6,31)	43,82( $\pm$ 5,79)	44,7( $\pm$ 6,15)	45,20( $\pm$ 6,52)	44,8( $\pm$ 5,79)
7000Hz	43,75( $\pm$ 5,69)	45,1( $\pm$ 5,98)	43,58( $\pm$ 5,55)	42,4( $\pm$ 5,21)	42,58( $\pm$ 5,83)	41,3( $\pm$ 5,17)
10.000Hz	45,87( $\pm$ 6,33)	56,2( $\pm$ 8,32)	43,29( $\pm$ 5,88)	44,4( $\pm$ 5,84)	41,28( $\pm$ 5,12)	48,8( $\pm$ 6,58)

Nos gráficos abaixo, é demonstrado o índice do ganho de atividade em relação a atividade espontânea.

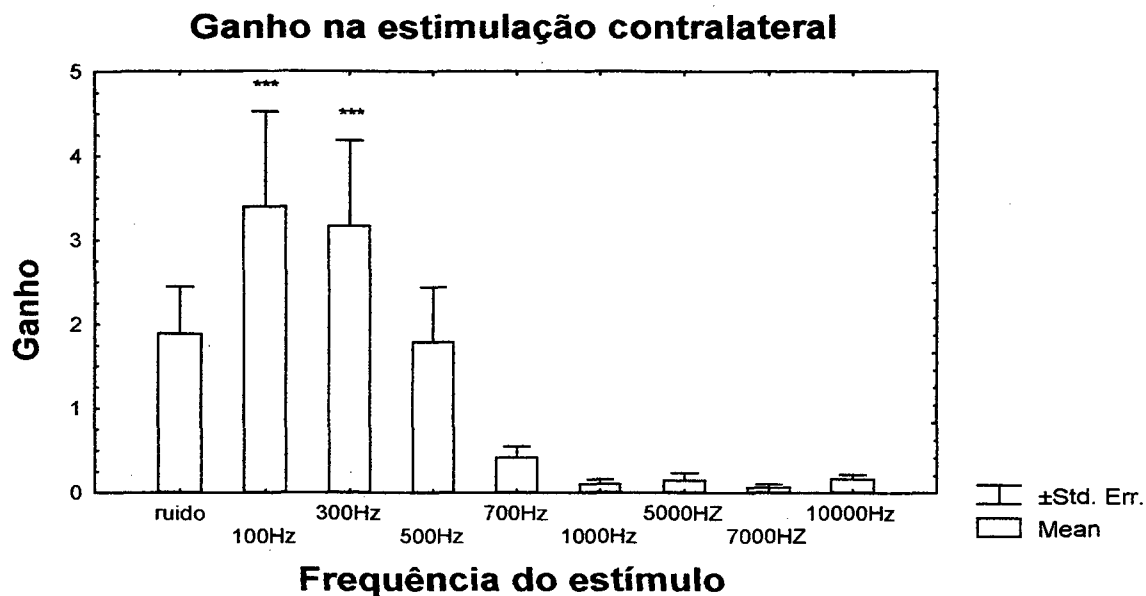


**Figura 9** - Respostas (média  $\pm$  E.P.M.) na estimulação binaural. Os maiores ganhos ocorreram com as baixas frequências de estimulação.. (\*\*\*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação as frequências de 700Hz até 10.000Hz. (#) indica diferença estatisticamente significativa em relação as frequências de 100, 5.000 e 7.000Hz. ( F (df 1,2)= 8,44 Rao R ( 24,1273) = 3,73;  $p < 0,00$ ).



**Figura 10** - Ganho médio na estimulação ipsilateral com relação ao lado do registro (média  $\pm$  E.P.M.). (\*\*\*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação as frequências de 7.000Hz a 10.000Hz ( F (df 1,2)= 8,44 Rao R ( 24,1273) = 3,73;  $p < 0,00$ ).





**Figura 11** - Ganho médio na estimulação contralateral (média  $\pm$  E.P.M.). (\*\*\*) indicam diferenças significantes estatisticamente em relação as frequências de 700Hz a 10.000Hz. Ruído e frequências de 500Hz não demonstram diferença estatística contudo apresentam um ganho médio considerável.  $F (df 1,2) = 8,44$  Rao R ( 24,1273) = 3,73;  $p < 0,00$ ).

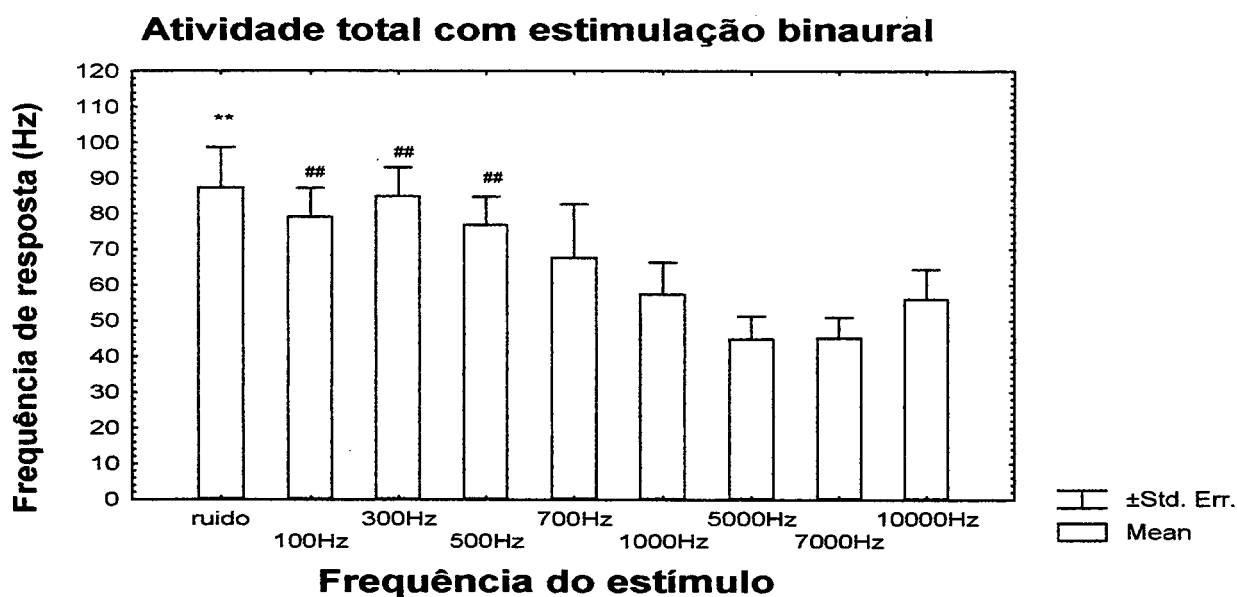
Os registros analisados quanto ao índice de atividade em relação a atividade espontânea revelaram que houve um incremento significativo da atividade com a apresentação de ruído e tons puros de 100, 300 e 500Hz, de acordo com as figuras 9, 10 e 11.

**Tabela 2.** Ganho médio da frequência ( $\pm$ E.P.M.) na presença de um estímulo de acordo com o lado estimulado.

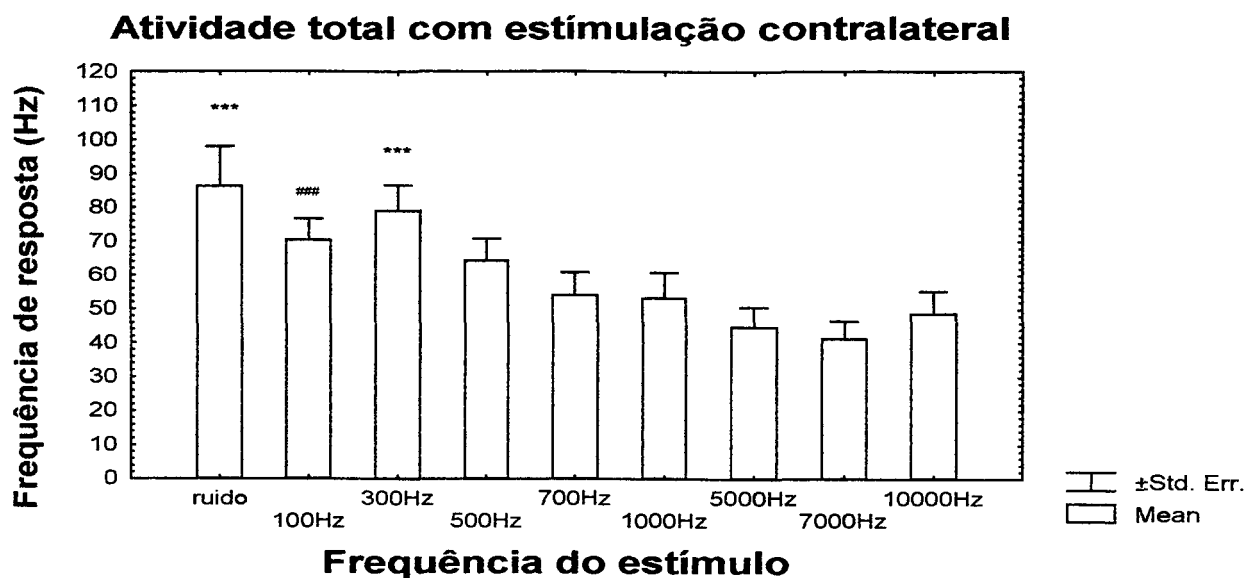
Grupo	Binaural	Contralateral	Ipsolateral
Ruído	1,78 ( $\pm$ 0,53)	1,88( $\pm$ 0,56)	3,29( $\pm$ 1,27)
100Hz	3,44 ( $\pm$ 0,92)	3,39 ( $\pm$ 1,13)	3,00( $\pm$ 0,87)
300Hz	2,75 ( $\pm$ 0,71)	3,16 ( $\pm$ 0,01)	2,66( $\pm$ 0,80)
500Hz	1,48 ( $\pm$ 0,32)	1,79 ( $\pm$ 0,65)	1,62( $\pm$ 0,42)
700Hz	0,38 ( $\pm$ 0,09)	0,42 ( $\pm$ 0,13)	0,41( $\pm$ 0,95)
1000Hz	0,18 ( $\pm$ 0,06)	0,10 ( $\pm$ 0,50)	0,14( $\pm$ 0,55)
5000Hz	0,56 ( $\pm$ 0,03)	0,14 ( $\pm$ 0,84)	0,33( $\pm$ 0,42)
7000Hz	0,38 ( $\pm$ 0,04)	0,62 ( $\pm$ 0,04)	0,85( $\pm$ 0,46)
10.000Hz	0,27 ( $\pm$ 0,06)	0,17 ( $\pm$ 0,45)	0,0( $\pm$ 0,37)

Na tabela 2 observou-se que o incremento médio quando da apresentação de ruído é menor em relação aos estímulos de tons puros nas frequências de 100 e 300Hz. Não há diferença estatisticamente significativa quanto ao lado estimulado de acordo com ANOVA  $F(df1,2) = 2,327$  Rao's  $R(18,638) = 2,04$ ;  $p < 0,0065$ ). Esta diferença que se encontra como significativa ao ser investigada com mais detalhes se localizava na frequência de estímulo de 10.000Hz. Desta forma não foi considerada, pois o equipamento utilizado não tinha competência para gerar um tom puro nesta frequência, podendo haver interferência eletromagnética.

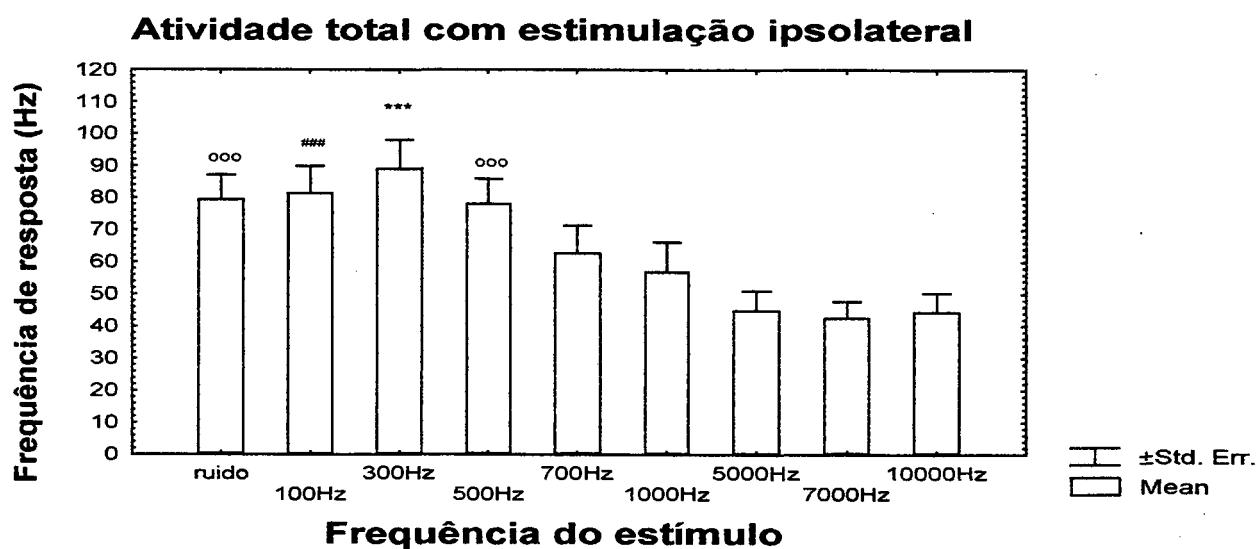
Na análise da atividade total da unidade celular auditiva demonstrada nos gráficos das figuras 12, 13 e 14 observa-se que na apresentação de ruído e frequências de 300Hz houve uma resposta de atividade semelhante. O maior aumento de atividade ocorreu na presença de estímulos sonoros de baixas frequências. Entre as baixas frequências a maior atividade observada se deu na presença do estímulo sonoro de 500Hz.



**Figura 12** – Atividade neuronal com estimulação sonora binaural ( $\pm$  E.P.M.). (\*\*) indica diferença estatisticamente significativa em relação as frequências de 1000Hz até 10.000Hz. (##) indicam diferenças em relação as frequências de 5000Hz e 7000Hz. (ANOVA F ( df 1,2 ) = 8,441 Rao R ( 24,1273 ) = 3,01;  $p < 0,001$ ).



**Figura 13** - Atividade de resposta com estimulação sonora contralateral ao lado do registro. (\*\*\*) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação as frequências de 700Hz até 10.000Hz. (###) indicam diferença em relação a s frequências de 500Hz e 7000Hz. (ANOVA F ( df 1,2 ) = 8,441 Rao R ( 24,1273 ) = 3,01;  $p < 0,001$ ).



**Figura 14** - Atividade neuronal com estimulação sonora ipsolateral ao local do registro. (\*\*\*) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação as frequências de 700Hz até 10.000Hz. (###) indicam diferenças em relação as frequências de 1000Hz até 10.000Hz. (ooo) indicam diferenças em relação as frequências de 5000Hz até 10.000Hz (ANOVA F ( df 1,2 ) = 8,441 Rao R ( 24,1273 ) = 3,01;  $p < 0,001$ ).

Os resultados demonstraram que a atividade de resposta das 25 (vinte e cinco) células auditivas registradas é maior na apresentação de ruído e em frequências de tons puros de 100, 300 e 500Hz. A análise dos resultados feita sob diferentes aspectos, tais como, a frequência de resposta da célula, a comparação das frequências espontânea e a atividade total com estimulação, o índice de ganho em relação a atividade espontânea e por último a atividade total simplesmente, demonstraram que as células auditivas pesquisadas não têm relação com a localização do estímulo, se binaural, contralateral ou ipsilateral, mas apresentam uma discriminação tonal seletiva para faixas de frequências baixas.

## IV - DISCUSSÃO

### 1. Localização Anatômica das Unidades Registradas.

Os resultados demonstram que as coordenadas das unidades auditivas registradas encontram-se entre 6,0mm e 4,0mm anterior ao zero interaural. No entanto a maior frequência de distribuição das células está entre 4,5mm e 5,5mm anterior. Em relação ao eixo médio-lateral as unidades se localizam entre 1,0mm e 2,0mm do plano sagital. No eixo vertical, onde ocorreu o maior espalhamento, as unidades auditivas foram encontradas entre 4,0mm e 7,0mm, superior ao zero interaural. Esta distribuição sugere que as unidades auditivas pesquisadas não formam um núcleo bem localizado, podendo corresponder a uma via de condução da informação auditiva, contendo tanto corpos celulares como axônios.

A região estudada se estende da borda ântero-lateral dorsal do nBor ou núcleo ectomamilar, no mesencéfalo ventral, até o trato quintofrontal no diencéfalo. Também foram encontradas unidades auditivas circundando o trato occipitomesencefálico, o qual se projeta para o hipotálamo com informações sensoriais. As aferências do arquiestriado intermédio, parte ventromedial (componente somatosensoriomotor), seguem pelo trato occipitomesencefálico aos núcleos auditivos talâmicos, passando pelo mesencéfalo até o metencéfalo (bulbo), (Wild et al. (1993). Neste estudo experimental, a maioria das unidades auditivas encontradas circundam a ansa lenticular.

As unidades registradas não se encontram em núcleos auditivos ou próximos a estes, porém, circundam estruturas somatossensoriais e motoras, sugerindo formarem um conjunto de fibras.

## **2. Atividade Espontânea das Unidades Registradas.**

De acordo com a literatura as fibras auditivas têm uma AE com frequência relativamente alta, em média de 90Hz, que pode variar entre 20Hz e 200Hz, com uma distribuição monomodal segundo os estudos de Schermuly e Klinke (1990).

Os dados desta pesquisa revelam que a atividade espontânea (AE) das unidades auditivas não variou durante o período de experimentação. A frequência média da AE demonstrada em nossos experimentos foi de 47,4Hz, com distribuição monomodal, isto é, ela se manteve constante em uma estreita faixa de atividade. Estes dados contrastam com os de Warchol et al. (1989) e de Hill et al. (1989) que verificaram que a AE no núcleo angular e gânglio coclear, respectivamente, varia de acordo com a frequência característica do neurônio.

Em um trabalho de Klinke e Smolders (1993), eles demonstraram que fibras que contactam as células ciliadas curtas, intermédias e altas, as quais se originam de uma determinada posição ao longo da membrana basilar, distante do ápice 1,91mm; 1,97mm e 2,05mm ( em média 2mm) apresentam AE com frequências de 80Hz, 62Hz e 85Hz, respectivamente. Considerando que nesta região existem unidades que tendem a ser sensíveis a baixas frequências. De acordo com Smolders et al. (1995), neurônios com baixa FC na média têm uma alta AE.

A AE média encontrada por Hill et al. (1989) no gânglio coclear e núcleo angular foi de 34 Hz menor portanto do que a demonstrada no presente experimento, que foi em média de 47,4Hz. Nos resultados desta pesquisa a tendência de variação da AE de acordo com a FC não foi observada pois segundo os testes estatísticos a pequena variação observada não é estatisticamente significativa. Os resultados de Richter et al. (1996) mostram que a AE nas fibras auditivas primárias de pombos é de aproximadamente 93Hz, com distribuição unimodal. Estes resultados estão próximos daqueles obtidos por Schermuly e Klinke (1990), que registrou uma AE média de 115Hz, e os de Smolders et al. (1995), cuja taxa de AE registrada foi de 91Hz com distribuição também unimodal. Neste experimento, os resultados por outro lado, apresentam unidades com atividade espontânea com aproximadamente a metade destes valores. Uma vez que a AE tende a diminuir em alguns níveis mais rostrais, como no núcleo caudal (Maekawa, 1987) e MLd (Lewald, 1990) pois na retransmissão dos sinais ocorre um processo de inibição.

Para demonstrar que a idade dos animais tem relação direta com a maturação das fibras nervosas, Richter et al. (1996) registraram a AE no gânglio coclear de animais em desenvolvimento. Em seus experimentos foram utilizados animais com 1, 2, e 3 semanas e 1, 2, 3 e 4 anos de idade os quais revelaram um AE com frequência média de 34,5 Hz; 60,8 Hz; 87,5 Hz; 93,3 Hz; 121,8 Hz; 59,7 Hz e 89,2 Hz, respectivamente, com distribuição unimodal. Os autores perceberam que para animais imaturos (1-2 semanas) tanto a AE como a FC têm frequências mais baixas e que com a maturação a AE aumenta com aumento da FC das fibras.

Ainda outros autores como Warchol et al. (1989); fizeram experimentos no núcleo coclear, especificamente no NA, onde demonstraram a existência de unidades auditivas sensíveis a altas frequências e outras a baixas frequências. Estes autores se ativeram a demonstrar a AE das unidades auditivas sensíveis a baixas frequências, entre 10



Hz e 800 Hz a uma intensidade de 60 dB, e que denominaram de unidades de baixas frequências. A AE média destas unidades foi de 38,6 Hz, variando de 10 Hz a 160 Hz. Estes dados convergem para aqueles obtidos neste experimento, cujas unidades auditivas são sensíveis a frequências mais baixas (100 Hz a 500 Hz) porém se situam a níveis cerebrais mais elevados. De acordo com Warchol et al. (1989) a AE para unidades sensíveis a baixas frequências é menor do que para unidades sensíveis a altas frequências. Estes dados no entanto contrastam com os de Smolders et al. (1995) e Köppl (1997), que afirmam que neurônios com baixa FC na média têm uma alta AE, demonstrando que a AE tem correlação com a FC. Num estudo feito por Köppl (1997) no nervo auditivo e no núcleo magnocelular (MN) foi registrada uma AE média de 72,2Hz e 219,4Hz, respectivamente. Isto demonstra que a AE no NM é muito mais elevada do que no nervo coclear. Os dados apresentados possuem um valor intermediário entre a frequência geralmente encontrada nas fibras auditivas primárias e os estágios finais do processamento.

Da mesma forma que nas fibras auditivas primárias, a AE nas fibras auditivas secundárias também foi estudada por Modgans e Knudsen (1993), que verificou que fibras no núcleo ventral do lemnisco lateral parte posterior (VLVp) localizado no metencéfalo, tem uma AE que varia de 0 a 78Hz, observada em registros unitários, sendo que cerca da metade dos registros multiunitários não exibia AE. Através deste experimento nota-se que as fibras secundárias têm um comportamento bastante distinto no que diz respeito a ausência de AE encontrada nos experimentos de Modgans e Knudsen (1993).

Considerando a AE em fibras auditivas de núcleos mais superiores como o núcleo mesencefálico lateral dorsal (MLd), registros eletrofisiológicos feitos por Lewald (1990) demonstraram que muitos neurônios são espontaneamente ativos numa faixa de frequência que varia de 0,2 a 117,3Hz (média de 16,4Hz), cujos resultados demonstram a

natureza irregular da AE das fibras auditivas em aves. Nota-se neste núcleo um comportamento próprio, cuja média da frequência de atividade não se assemelha aos nossos resultados (média de 47 Hz).

Da mesma forma que alguns autores demonstraram a taxa da AE nas fibras auditivas de núcleos exclusivamente auditivos, outros verificaram a AE em núcleos bimodais. No tálamo de pombos, especificamente no núcleo dorsolateral posterior (DLP) e no núcleo dorsolateral intermédio ventral anterior (DIVA), a média da AE se situava entre 1Hz a 20Hz, mas algumas vezes chegava a 116Hz. Estas frequências de AE foram registradas nas partes mais ventrais do DLP e DIVA (Schneider e Necker, 1996).

Algumas características da AE observadas na presente pesquisa merecem um exame mais detalhado. A frequência da AE registrada durante 3 (três) segundos foi menor após os períodos de estimulação que ocasionaram respostas mais contundentes. Isto indica uma latência para a recuperação da atividade espontânea que ocorreu pelo menos em parte no período dado para a sua recuperação. Estes dados estão de acordo com os resultados de Hill et al. (1989) que demonstraram uma adaptação das fibras auditivas após estimulação sonora. De uma forma geral, encontramos dados na literatura que demonstram que a AE têm uma alta frequência, com exceção aos resultados de Hill et al (1989) que encontraram uma AE com frequência mais baixa, similar a encontrada nesta pesquisa. No entanto os resultados deste autor foram obtidos no gânglio coclear e os desta pesquisa no mesencéfalo.

### **3. Influência do Estímulo Binaural e Monaural**

A diferença de sensibilidade nos dois ouvidos pode indicar uma percepção da direcionalidade da fonte sonora. Neste experimento os animais foram estimulados binaural e

monauralmente sem a oclusão mecânica do conduto auditivo. A frequência de resposta na estimulação binaural variando a frequência do estímulo sonoro não apresentou diferenças estatisticamente significantes quando comparada com a estimulação ipsolateral e contralateral. Como a estimulação monaural consistia apenas da ausência da apresentação do estímulo sem a oclusão mecânica do conduto auditivo contralateral pode-se entender que a estimulação não foi exclusivamente, mas predominantemente monaural. Isto porque, a via interaural permite a passagem do som até a orelha contralateral, com uma perda no nível da pressão sonora de 10-20dB para baixas frequências de estímulo (menor que 250Hz), e 10 a 15 dB para frequências mais elevadas (Rosowski e Saunders, 1980). Assim sendo, para produzir uma estimulação igual na cóclea, é necessário considerar a diferença obtida entre os níveis de pressão sonora ipsolateral e contralateral, que representa o aumento na intensidade do som necessária no ouvido contralateral.

Além da condução interaural, um segundo motivo para não termos ocluído os condutos por ocasião da estimulação monaural foi a possibilidade de induzirmos uma vibração na cabeça dos animais, ativando o sistema auditivo por condução óssea dado a leveza dos microfones.

Podemos entender que as unidades em estudo não apresentaram uma diferença em função do lado estimulado, e que portanto a diferença de pressão sonora interaural não deve estar sendo computada por estas células para inferência da localização do som. Todavia, não fica descartada a sua participação em um processo direcional, pois não foi apreciada a suas sensibilidades às latências de respostas.

#### 4. Característica de Frequência das Unidades registradas.

Na via auditiva clássica podemos identificar características próprias em registros eletrofisiológicos de núcleos específicos, desde o gânglio coclear até núcleos superiores, de segunda e terceira ordem, como o núcleo mesencefálico (MLd).

Entre as várias espécies de aves a característica de frequência encontrada em neurônios auditivos alcançam frequências de 50 até 10.000Hz. No entanto existem neurônios que respondem a frequências sonoras muito inferiores, abaixo de 20Hz, denominadas unidades infrasonoras, as quais foram demonstradas por Shermuly et al. (1990), no gânglio coclear de pombos. As unidades com FC baixa (132 Hz) se caracterizam por uma alta atividade espontânea (média de 115Hz). Notamos que estes resultados coincidem com os de Smolders et al. (1995) e de Köppl (1997) relatados anteriormente.

Os dados aqui apresentados revelam que há um predomínio de melhor resposta nas baixas frequências de estímulo entre ruído, 100, 300 e 500Hz. Nesta faixa de FC, as respostas se situam entre 41Hz e 89Hz, preferencialmente em 80Hz.

Jones e Jones (1995), em seus estudos eletrofisiológicos, determinaram o mapa tonotópico da cóclea em embriões de pintos com 19 dias de incubação (E19). Neste estudo demonstraram que nas fibras aferentes a FC mais baixa foi de 188Hz e a mais alta, de 1623Hz. O mesmo autor conclui que esta FC se mantém com a maturidade para unidades responsivas a baixas frequências. Todavia, estes resultados foram obtidos em embriões de pintos pelo que se torna difícil a comparação com nossos dados, obtidos em pombos adultos.

Comparativamente, Richter et al. (1996), demonstraram o padrão de atividade no gânglio coclear de pombos e a FC destes animais com 1, 2 e 3 semanas, e 1, 2, 3 e 4 anos

de idade. Não foram observadas diferenças entre os grupos de idades diferentes, e os valores de FC se situavam entre 63 e 1829Hz, preferencialmente entre 100 e 1000Hz. A diferença quanto a AE e o índice de ativação das fibras nas diferentes idades são geralmente significantes se a FC das fibras forem abaixo de 1.300Hz. Estes dados se aproximam dos apresentados nesta pesquisa, cuja FC é um pouco menor do que a demonstrada por estes autores. Ainda no gânglio coclear de pombos de acordo com estudos feitos por Klinke e Smolders (1993), foi demonstrado que as fibras auditivas que enervam as células ciliadas altas, intermédias e curtas, apresentam FC de 630, 710 e 750 Hz respectivamente. A maioria das fibras auditivas da membrana basilar podem ser ativadas por sons de frequências na faixa de 30Hz a 6.000Hz. Notamos que estes dados englobam as FC observadas no presente experimento, onde sw obteve uma resposta média de aproximadamente 80Hz numa faixa de 100Hz a 500Hz, como visto anteriormente, demonstrando que as unidades auditivas por nós estudadas são sensíveis a baixas frequências de estímulo. Segundo Smolders et al. (1995), a FC encontrada em fibras aferentes esteve entre 20 e 4.000Hz com 4 - 76 dB; porém a maioria das fibras (68%) tinham FC com melhores respostas entre 200 e 1.300Hz com um predomínio em 700Hz. Demonstraram também que neurônios com FC de cerca de 1.000Hz são mais sensíveis. Os mesmos autores registraram a maior FC na base da membrana basilar em 5.980Hz e no ápice em 21Hz. Estes dados estão de acordo com os de Richter et al. (1996). Porém Richter et al. (1995), já haviam demonstrado que no gânglio coclear de pombos a FC das fibras estava entre 68 e 1.414Hz, cujo estímulo usado consistia de uma explosão sonora com até 95 dB. Então, no gânglio coclear de pombos os dados de Jones e Jones (1995) estão de acordo com os de Richter et al. (1995, 1996) que demonstraram valores semelhantes de FC. As divergências nos resultados podem estar relacionadas com a técnica de estimulação usada, considerando-se a frequência do estímulo, característica do som (tom puro ou explosão

sonora) e o nível de pressão sonora. Comparativamente aos resultados desta pesquisa, percebe-se uma concordância com os resultados de Klinke e Smolders (1993), uma vez que a FC nos registros (100, 300 e 500Hz), foi próxima àquela demonstrada por este autor (630, 710 e 750Hz).

No núcleo angular de aves (*Gallus domesticus*) existem unidades responsivas a baixas frequências de estímulo, entre 10 e 800Hz a 60 dB, segundo Warchol e Morest (1989). Especificamente neste núcleo as unidades com baixas FC se situam ventralmente e as unidades com altas FC se situam mais dorsalmente, predominando aquelas com FC baixa. De acordo com o mesmo autor, as FC ficaram entre 48 e 300 Hz. Percebemos que os dados destes autores se assemelham aos encontrados por nós, onde se percebe uma maior sensibilidade das unidades auditivas a baixas frequências de estímulos.

Dados eletrofisiológicos de Cohen e Knudsen (1996) mostram a representação das frequências no telencéfalo de corujas. Os estímulos consistiam em uma explosão sonora de 100 a 11.000Hz, com duração de 50ms. O registro feito em unidades e multiunidades revelou que as melhores respostas são obtidas com estímulos de frequência entre 200 e 8.800Hz, com um pico nas baixas frequências, entre 1.000 e 3.000Hz e nas altas frequências, entre 5.000 e 8.000Hz. Ainda no núcleo basalis, no lobo frontal, as unidades responsivas a estímulos auditivos, têm uma CF que varia de 620Hz a 8.900Hz, que demonstrou ser idêntica àquela de outros níveis da via auditiva (campo L de Rose, MLd e núcleo coclear), de acordo com os resultados de Maekawa (1987).

Pode-se entender que as unidades em estudo não constituem um núcleo auditivo, não fazendo parte de nenhum dos núcleos da via auditiva clássica, no entanto as semelhanças nos resultados com os observados na literatura sugerem tratar-se de um conjunto de fibras com características eletrofisiológicas de neurônios auditivos. Tais fibras

não parecem envolvidas com a localização da fonte sonora mas apresentam uma discriminação tonal que permite a determinação de sua frequência característica.

Para uma determinação específica e conclusiva das fibras auditivas estudadas haveria necessidade de uma continuidade desta pesquisa através da injeção de drogas ou marcadores neuronais (neurotraçadores), anterógrados e retrógrados, que permitam identificar as projeções destas fibras.

## V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORD, R. L. The anatomy of the avian auditory system. **Ann NY Acad. Sci.**, 167:186-198, 1969.

BRAINARD, M. S.; KNUDSEN, E. I. Experience-dependent plasticity in the inferior colliculus: A site for visual calibration of the neural representation of auditory space in the barn owl. **The Journal of Neuroscience**, 13(11) : 4589-4608, 1993.

BRAINARD, M. S.; KNUDSEN, E. I.; ESTERLY, S. D.. Neural derivation of sound source location: resolution of spatial ambiguities in binaural cues. **J. Acoust. Soc. Am.**, 91(2):1015-1027, 1992.

BUTLER, A. B; HODOS, WILLIAN. **Comparative Vertebrate Neuroanatomy. Evolution and Adaptation**. Willey-Liss. New York, pp. 201-322, 1996.

COHEN, D. H.; KARTEN, H. J. The structural organization of avian brain. In "**Birds, Brain and Behavioral**". (I. J. Goodman and Schein M. W., eds.). Academic Press, New York, pp. 29-73, 1974.

COHEN, Y. E.; KNUDSEN, E. E. Representation of frequency in the primary auditory field of the barn owl forebrain. **Journal of Neurophysiology**, 76(6):3682-3692, 1996.



- COHEN, Y. E.; KNUDSEN, E. E. Representation of binaural spatial cues in field L of the barn owl forebrain. **Journal of Neurophysiology**, 79(2):879-890, 1998.
- COHEN, Y. E.; KNUDSEN, E. I. Auditory tuning for spatial cues in the barn owl basal ganglia. **Journal of Neurophysiology**, 72 (1):285-298, 1994.
- CONLEE, J. W.; PARKS, T. N. Origin of ascending auditory projections to the nucleus mesencephalicus lateralis pars dorsalis in the chicken. **Brain Research**, 367:96-113, 1986.
- CORREIA, M. J.; EDEM, A. J.; WESTLUND, K. N.; COULTER, J. D. Organization of ascending auditory pathways in the pigeon (*Columba livia*) as determined by autoradiographic methods. **Brain Research**, 234:205-212, 1982.
- COTANCHE, D. A. Development of hair cell stereocilia in the avian cochlea. **Hear Res.**, 28:35-44, 1987.
- COTANCHE, D. A. Regeneration of the tectorial membrane in the chick cochlea following severe acoustic trauma. **Hearing Res.**, 30:197-206, 1987.
- COTANCHE, D. A.; COTTON, C. U.; GATZY, J. T.; SULIK, K. K. Ultrastructural and electrophysiological maturation of the chick tegmentum vasculosum. **Hear Res.**, 25:125-139, 1987.

- DOOLING, R. J. Auditory perception in bird. In: D.E. Kroodsma and E. H. Miller (Eds.), **Acoustic Communication in Bird**. Academic Press, New York, Vol. 1, pp. 95-130, 1982.
- FARNER, D. S.; KING, J. R.; PARKES, K. C. **Avian biology. Vol. IX**. London: Academic Press Limited. Hartcourt Brace & Company, 1993. p 53-118.
- FISCHER, F.P.; KÖPPL, C.; MANLEY, G. A .The papilla basilar of the barn owl *Tyto alba*: a quantitative morphological SEM analysis. **Hear Res.**, **34**(1):87-101, 1988.
- FUCHS, P. A .; EVANS, M. G.; MURROW, B. W. Calcium currents in hair cells isolated from the cochlea of the chick. **J. Physiol.**, **429**:553-568, 1990.
- GERGES, S. N.Y. **Ruído**. Fundamentos e controle. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1992. p 01-401.
- GLEICH, O .; MANLEY, G. A .Quantitative morphological analysis of the sensory epithelium of the starling and pigeon basilar papilla. **Hear Res.**, **34**(1):69-85, 1988.
- HILL, K. G.; MO, J.; STANGE, G. Exitation and supression of prirary auditory fibres in the pigeon. **Hearing Research**, **39**:37-48, 1989.
- JONES, S. M.; JONES, T. A . The tonotopic mao in the embryonic chicken cochlea. **Hearing Research**, **82**: 149-157, 1995.

KAISER, A. ; MANLEY, G. A .Brainstem connections of the macula lagenae in the chicken.

**J. Comp. Neurol.**, **374**(1):108-117, 1996.

KARTEN, H. J. The ascending auditory pathway in the pigeon (*Columba livia*). II.

Telencephalic projections in the nucleus ovoidalis thalami. **Brain Res.**, **11**:134-153, 1968.

KARTEN, H. J.; HODOS, W. A **Stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*)**. Baltimore: Johns Hopkins Press, 1967.

KLINKE, R.; SMOLDERS, J. W. TH. Performance of the avian inner ear. **Brain Research**, **97**:31-43, 1993.

KNUDSEN, E.I.; BRAINARD, M. S. Creating a unified representation of visual and auditory space in the brain. **Annu. Rev. Neurosc.**, **18** : 19-43, 1995.

KNUDSEN, E. I. Early auditory experience aligns the auditory map of space in the optic tectum of the barn owl. **Science**, **222**:939-942, 1983.

KNUDSEN, E. I.; BRAINARD, M. S. Visual instruction of the neural map of auditory space in the developing optic tectum. **Science**, **253** : 85-87, 1991.

- KNUDSEN, E. I.; KNUDSEN, P. F. Space- mapped auditory projections from the inferior colliculus to the optic tectum in the barn owl. (*Tyto alba*). **Journal of Comparative Neurology**, **218**: 187-196, 1983.
- KNUDSEN, E. I.; KONISHI, M. Space and frequency are reoresented separately in auditory midbrain of the owl. **Journal of Neurophysiology**, **41**(4): 870-884, 1978.
- KONISHI, M. Development of auditory neuronal responses in avian embryos. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **70**:1795-1798, 1973.
- KONISHI, M.; TAKAHASHI, T. T.; WAGNER, H.; SULLIVAN, W. E.; CARR. C. E. Neurophysiological and anatomical substrates of sound localization in the owl. In: **Auditory function: Neurobiological bases of hearing**. (Edelman, G.M.; Gall, W. E.; Cowan, W. M., eds.) New York: Willey. pp 721-745,1988.
- KÖPPL, C. Frequency tuning and spontaneous activity in the auditory nerve and cochlear magnocelularis of the barn owl *Tyto alba*. **Journal of Neurophisiology**, **77**(1):364-377, 1997.
- KÖPPL, C. Phase locking to high frequencies in the auditory nerve and cochlear nucleus magnocelularis of the barn owl, *Tyto alba*. **The Journal of Neuroscience**, **17**(9):3312-3321, 1997.

KÖPPL, C.; CARR, C. E. Low-frequency pathway in the barn owl's auditory brainstem. **The Journal of Comparative Neurology**, **378**:265-282, 1997.

LEWALD, J. Neural mechanisms of directional hearing in the pigeon. **Exp. Brain Res.**, **82**:423-436, 1990.

LIPPE, W. R. Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. **J Neurosci.**, **14**:1486-1495, 1994.

LIPPE, W.; RUBEL, E. Ontogeny of tonotopic organization of brain stem auditory nuclei in the chicken: implications for development of the place principle. **The Journal of Comparative Neurology**, **237**:273-289, 1985.

MAEKAWA, M. Auditory responses in the nucleus basalis of the pigeon. **Hearing Research**, **27**:231-237, 1987.

MANLEY, G. A. Preferred intervals in the spontaneous activity of primary auditory neurons. **Naturwissenschaften**, **66**:583-584, 1979.

MANLEY, G. A. The avian hearing organ: a status report. In: **Advances in Hearing Research**, Edited by G. A. Manley; G. M. Klump; C Köppl; H. Fastl and H. Oeckinghaus. Singapore: World Scientific, p. 219-229, 1995.

MANLEY, G. A .; KÖPPL, C.; KONISHI, M. A neural map of interaural intensity differences in the brain stem of the barn owl. **J. Neurosc.**, 8(8):2665-2676, 1988.

MANLEY, G.A . **Peripheral Hearing Mechanisms in Reptiles and Birds**. Springer, Berlin, 188 pp. 1990.

MIDDLEBROOKS, J. C.; KNUDSEN, E. I. A neural code for auditory space in the cat's superior colliculus. **J. Neurosc.**, 14:2621-2634, 1984.

MODGANS, J.; KNUDSEN, E. I. Early monaural occlusion alters the neural map of interaural level differences in the inferior colliculus of the barn owl. **Brain Research**, 619 : 29-38, 1993.

MOGDANS, J.; KNUDSEN, E. I. Site of auditory plasticity in the brain stem (VLVp) of the owl revealed by early monaural occlusion. **Journal of Neurophysiology**, 72 (6): 2875-2891, 1995.

MOGDANS, J.; KNUDSEN, E. I. Representation of interaural level difference in the VLVp, the first site of binaural comparison in the barn owl's auditory system. **Hearing Research**, 74: 148-164, 1994.

MOISSEF, A .; KONISHI, M. Neuronal and behavioral sensitivity to binaural time differences in the owl. **J. Neurosc.**, 1(1):40-48, 1981.

- MURROW, B. W.; FUCHS, P. Preferential expression of transiente current (IA) by “short” hair cells of the chick’s cochlea. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **242**(1305):189-195, 1990.
- NECKER, R. Hearing. In **“Physiology and Behavior of the pigeon”** (M. Abs., eds.). Academic Press. San Diego, pp. 193-219, 1983.
- OLSEN, J. F.; KNUDSEN, E. I.; ESTERLY, S. D. Neural maps of interaural and intensity differences in the optic tectum of the barn owl. *Journal of Neuroscience*, **9**(7): 2591-2605, 1989.
- PICKLES, J. O .; BRIX, J.; MANLEY, G. A . Influence of collagenase on tip links in hair cells of the chick basilar papilla. *Hear Res.*, **50**(1-2):139-143, 1990.
- REBILLAR, M.; PUJOL, R. Innervation of the chicken basilar papilla during its development. *Acta Otolaryngol. Stocks*, **96**:379-388, 1983.
- RICHTER, C. P.; HEYNERT, S.; KLINKE, R. Rate-intensity of pigeon auditory primary afferents. *Hearing Research*, **83** : 19-25,1995.
- RICHTER, C. P.; SAUER, G.; HOIDIS, S.; KLINKE, R. Development of activity patterns in auditiry nerve fibres of pigeon. *Hearing Research*, **95** : 77-86, 1996.

- ROSOWSKI, J. J.; SAUNDER, J. C. Sound transmission through the avian interaural pathways. **Journal Com. Physiol. A.**, 136:183-190, 1980.
- SCHERMULY, L.; KLINKE, R. Infrasound sensitive neurones in the pigeon cochlear ganglion. **J. Com. Physiol. A.**, 166:355-363, 1990.
- SCHERMULY, L.; KLINKE, R. Change of characteristic frequency of pigeon primary auditory afferents with temperature. **Journal Com. Physiol. A.**, 156:209-211, 1985.
- SCHNEIDER, A.; NECKER, R. Electrophysiological investigations of the somatosensory thalamus of the pigeon. **Exp. Brain. Res.**, 109:377-383, 1996.
- SHIMUZI, T.; KARTEN, H. J.; WODSEN, W. Intratelencephalic projections of the visual wulst in birds. **Soc. Neurosc. Abstr.**, 16:246, 1990.
- SMOLDERS, J.W.T.; DING-PFENNIGDORFF, D.; KLINKE, R. A functional map of the pigeon basilar papilla: correlation of the properties of single auditory nerve fibres and their peripheral origin. **Hearing Research**, 92 : 151-169, 1995.
- TAKAHASHI, T.T.; KELLER, C. H. Commissural connections mediate inhibition for the computation of interaural level difference in the barn owl. **J. Comp. Physiol.**, 170(2):161-169, 1992.



- TAKAHASHI, T. T.; BARBERINI, C. L.; KELLER, C. H. An anatomical substrate for the inhibitory gradient in the VLVp of the owl. **The Journal of Comparative Neurology**, **358**: 294-304, 1995.
- TAKAHASHI, T. T.; KONISHI, M. Projections of the cochlear nuclei and laminaris to the inferior colliculus of the barn owl. **The journal of Comparative Neurology.**, **274**:190-211, 1988.
- VEENMAN, C. L.; WILD, J. M.; REINER, A . Organization of the avian "Corticostriatal" projection system: A retrograde and anterograde pathway tracing study in pigeon. **The journal of Comparative Neurology**, **354**:87-126, 1995.
- VIETE, S.; PEÑA, J. L.; KONISHI, M. Effects of interaural intensity difference on the processing of interaural time difference in the owl's nucleus laminaris. **The Journal of Neuroscience**, **17**(5):1815-1824, 1997.
- VOLMAN, S. F.; KONISHI, M. Spatial selectivity and binaural responses in the inferior colliculus of the great horned owl. **The Journal of Neuroscience**, **9**(9):3083-3096, 1989.
- VON DÜRING, M.; ANDRES, K. H.; SIMON, K. The comparative anatomy of the basilar papillae in birds. **Fortschr. Zool.**, **30**:681-685, 1985.

- WARCHOL, M. E.; DALLOS, P. Neural response to very low-frequency sound in the avian cochlear nucleus. **J. Comp. Physiol. A** ., 166:83-95, 1989.
- WHITEHEAD, M.C.; MOREST, D. K. The growth of cochlear fibers and the formation of their synaptic endings in the avian inner ear: a study with the electron microscope. **Neuroscience**, 14:277-300, 1985.
- WILD, J. M. Convergence of somatosensory and auditory projections in the avian torus semicircularis, including the central auditory nucleus. **The journal of Comparative Neurology**, 358:465-486, 1995.
- WILD, J. M.; KARTEN, H. J.; FROST, B. J. Connections of auditory Forebrain in the pigeon (*Columba livia*). **The journal of Comparative Neurology**, 377:32-62, 1993.
- YOERG, S. I. **Hearing and vocalization in birds**. University of California, Berkley, 1992.
- ZEIER, H.; KARTEN, H. J. The archistriatum of the pigeon: organization of afferent and efferent connections. **Brain Res.**, 31:313-326, 1971.